

A MASP-2 terápiás célú gátlása és a MASP-3 szerepének feltárása irányított fehérjeevolúcióval kifejlesztett inhibitorokkal

Szakács Dávid

Doktori (PhD) értekezés

Témavezető: Dr. Pál Gábor, egyetemi docens

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Program

Programvezető: Prof. Kovács Mihály



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,

Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Közlemények	4
Köszönetnyilvánítás	5
Bevezetés	6
1. Irodalmi áttekintés	8
1.1. A szerin proteázok	8
1.2. Szerin proteáz inhibitorok	11
1.2.1. Kanonikus szerin proteáz inhibitorok és az enzim:inhibitor kölcsönhatás	11
1.2.2. A vázszerkezet függetlenség	14
1.3. A komplementrendszer	15
1.3.1. A komplementrendszer felépítése	16
1.3.2. A komplementrendszer aktiválódási útvonalai	18
1.3.3. A MASP-ok és a D-faktor szerkezete	24
1.3.4. A komplementrendszer effektor funkciói	26
1.3.5. A komplementrendszer szabályozása	27
1.3.6. A komplementrendszer érintettsége betegségekben és az útvonalszelektív inhibitorok jelentősége	29
1.4. Az irányított evolúciós megközelítés és a fágbemutató	31
2. A munka közvetlen előzményei és motivációja	33
2.1. A harmadik generációs MASP-2 inhibitorok kifejlesztésének előzményei és motivációja	33
2.1.1. A lektin út aktivációs modelljének korrekciója irányított evolúcióval fejlesztett szelektív MASP inhibitorok felhasználásával	33
2.1.2. A MASP-1 és MASP-2 mint gyógyszercélpont molekulák	34
2.2. A szelektív MASP-3 inhibitor fejlesztés előzményei és motivációja	36
3. Célkitűzések	40
4. Eredmények és tárgyalásuk	42
4.1. A MASP-2 inhibitorok harmadik generációjának kifejlesztése és jellemzése	42
4.1.1. A kiindulási inhibitor kiválasztása	42
4.1.2. A TFPI1 D2-fág könyvtár létrehozása és szelekciója	43

4.1.3.	Az emberi MASP-2 preferenciái az evolvált inhibitorok analóg pozícióiban függenek az inhibitor vázszerkezetétől	44
4.1.4.	A TFPI1 D2 legtöbb evolvált pozíciójában az emberi és a patkány MASP-2 aminosav preferenciái nagyon hasonlóak	46
4.1.5.	Harmadik generációs MASP-2 inhibitorok tervezése a szekvencia logók alapján	47
4.1.6.	A TFMI-2 variánsok hatékony inhibitorai az emberi és patkány MASP-2 enzimnek és nem gátolják az emberi MASP-1 és MASP-3 aktivitását	48
4.1.7.	A TFMI-2 variánsok hatékony és szelektív lektin út inhibitorok normál emberi szérumban	50
4.1.8.	A TFMI-2b a leghatékonyabb lektin út inhibitor patkány szérumban	57
4.1.9.	A TFMI-2 variánsok nem befolyásolják a véralvadást	58
4.1.10.	Konklúzió	59
4.2.	MASP-3 inhibitor kifejlesztése, jellemzése és alkalmazása a MASP-3 fiziológias szerepének felderítésére	61
4.2.1.	MASP-3 kötő klónok szelekciója a TFPI1 D2-fág könyvtárból	61
4.2.2.	A MASP-3 által szelektált inhibitor hurok szekvencia mintázat különösen hidrofób	61
4.2.3.	Szelektív MASP-3 inhibitor fehérje előállítása és jellemzése <i>in vitro</i>	62
4.2.4.	A TFMI-3 nem gátolja a véralvadást	64
4.2.5.	A TFMI-3 nem befolyásolja a komplementrendszer aktivációját	65
4.2.6.	A TFMI-3 egyedül a MASP-3 enzimhez köt emberi plazmában	66
4.2.7.	A MASP-3 a zimogén D-faktor egyedüli aktivátora nyugvó emberi vérben	67
4.2.8.	Konklúzió	71
5.	Anyagok és módszerek	74
5.1.	Rekombináns MASP fragmentumok és D-faktor	74
5.2.	Ecotin génkiütött <i>E. coli</i> törzsek létrehozása	74
5.3.	A fágbemutató műveletei	75
5.3.1.	A TFPI1 D2 megjelenítése a bakteriofág felszínén	75
5.3.2.	Kunkel templát előállítása	76
5.3.3.	Könyvtárkészítés	76
5.3.4.	A TFPI1 D2 könyvtár szelekciója emberi és patkány MASP-2, illetve emberi MASP-3 kötésre	77
5.3.5.	Egyedi variánsok enzimkötő képességének ellenőrzése	78

5.3.6.	Az irányított evolúciós kísérletek eredményeinek ábrázolása	78
5.4.	Expressziós vektorok létrehozása a TFPI1 D2 variánsok előállításához	79
5.5.	A TFPI1 D2 variánsok bakteriális expressziója és tisztítása	79
5.6.	Az inhibitorok koncentrációjának meghatározása	80
5.6.1.	Szarvasmarha tripszin aktív koncentrációjának meghatározása	80
5.6.2.	A TFPI1 D2 és a TFMI-2 variánsok koncentrációjának meghatározása	81
5.6.3.	A TFMI-3 variánsok koncentrációjának meghatározása	81
5.7.	Az inhibitorok egyensúlyi inhibíciós állandó (K_i) értékeinek meghatározása a MASP enzimekkel szemben.	81
5.8.	Felületi plazmon rezonancia (SPR) mérések	82
5.9.	Normál emberi szérummal végzett komplement ELISA kísérletek	83
5.9.1.	Wieslab teszt	83
5.9.2.	C3 depozíció híg emberi szérumból.	83
5.9.3.	C4 depozíció híg szérumból mannánnal, illetve AcBSA-val borított felszínen	84
5.9.4.	C4 depozíció előaktivált MBL:MASP komplexekkel	84
5.9.5.	Útvonal-szelektív komplement ELISA 2X híg szérummal	85
5.10.	Patkány szérummal végzett komplement ELISA kísérletek	86
5.10.1.	C3 depozíció híg patkány szérumból.	86
5.10.2.	C4 depozíció híg patkány szérumból.	86
5.10.3.	C5b-9 depozíció híg patkány szérumból.	87
5.11.	Véralvadási kísérletek	87
5.12.	TFMI-3 plazma pull-down, tömegspektrometria és adatelemzés	87
5.13.	Fluoreszcensen jelölt pro-FD hasadásának követése különböző plazma és szérum mintákban	88
	Összefoglalás	89
	Summary	90
	Irodalomjegyzék	91
	Rövidítésjegyzék	102
	Függelék	104

Közlemények

A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Szakács Dávid, Kocsis Andrea, Szász Róbert, Gál Péter, Pál Gábor

Novel MASP-2 inhibitors developed via directed evolution of human TFPI1 are potent lectin pathway inhibitors

The Journal of Biological Chemistry, (2019) 294 (20) 8227–8237.

doi: 10.1074/jbc.RA119.008315

Dobó József*, **Szakács Dávid***, Oroszlán Gábor, Körtvély Előd, Kiss Bence, Boros Eszter, Szász Róbert, Závodszy Péter, Gál Péter, Pál Gábor

MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked.

Scientific Reports, (2016) 6: 31877

doi: 10.1038/srep31877

*: a szerzők azonos mértékben járultak hozzá a munkához

A témában megjelent egyéb közlemények:

Oroszlán Gábor, Körtvély Előd, **Szakács Dávid**, Kocsis Andrea, Dammeier Sascha, Zeck Anne, Ueffing Marius, Závodszy Péter, Pál Gábor, Gál Péter, Dobó József

MASP-1 and MASP-2 do not activate pro-factor D in resting human blood, whereas MASP-3 is a potential activator: kinetic analysis involving specific MASP-1 and MASP-2 inhibitors.

The Journal of Immunology, (2016) 196 (2) 857-865.

doi: 10.4049/jimmunol.1501717

Gál Péter, Pál Gábor, **Szakács Dávid**

Lajstromszám: WO2018127719A3 (HU1700012A2)

Szabadalom

A témához nem kapcsolódó közlemények:

Szabó András, Héja Dávid, **Szakács Dávid**, Zboray Katalin, Kékesi A. Katalin, Radisky Evette S., Sahin-Tóth Miklós, Pál Gábor

High-Affinity Small Protein Inhibitors of Human Chymotrypsin C (CTRC) Selected by Phage Display Reveal Unusual Preference for P4' Acidic Residues.

The Journal of Biological Chemistry (2011) 286 (25): 22535–45.

doi: 10.1074/jbc.M111.235754

Boros Eszter, Sebák Fanni, Héja Dávid, **Szakács Dávid**, Zboray Katalin, Schlosser Gitta, Micsonai András, Kardos József, Bodor Andrea, Pál Gábor

Directed Evolution of Canonical Loops and Their Swapping between Unrelated Serine Proteinase Inhibitors Disprove the Interscaffolding Additivity Model.

Journal of Molecular Biology (2018) 431 (3) 557–575.

doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.003

Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Pál Gábornak szeretnék köszönetet mondani, amiért biztosította számomra a lehetőséget laboratóriumában a szakdolgozati és doktori munkám elvégzéséhez, munkámat tapasztalatával, hasznos meglátásaival és tanácsaival segítette. Külön hálás vagyok neki azért, hogy elsajátíthattam az irányított fehérjeevolúció gondolati hátterét és a fágbemutató gyakorlati fortélyait, valamint hogy az elmúlt években megismerkedhettem az alap kutatás mellett az alkalmazott kutatás világával is.

Köszönettel tartozom az Irányított fehérjeevolúció kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak az elmúlt tíz együtt töltött évről. Külön köszönettel tartozom Héja Dávidnak, aki bevezetett a kísérletes munka alapjaiba, és Boros Eszternek, aki a legjobb tanítványból a legsegítőkészebb kollégává és szerető társammá vált.

Köszönetet mondok Dr. Gál Péternek és kutatócsoportja tagjainak, Kocsis Andreának, Balczerné Júlcsinak, Dobó Józsefnek és Oroszlán Gábornak is a közös munkáért. Hálás vagyok, amiért maguk közé fogadtak, munkámban mindig támogattak és baráti légkört teremtettek.

Köszönettel tartozom Prof. Nyitrai Lászlónak, amiért doktori munkámat a Biokémiai Tanszéken, az ELTE örökös Legsportosabb Tanszékén végezhettem. Köszönöm a Biokémiai Tanszék közösségének a sok közös élményt: kirándulásokat, SzarvaslegELTEtést és Rókakergetést, esti társasjátékozást.

Munkám során együtt dolgozhattam számos kiváló partnerrel, akik tudásukkal és munkájukkal hozzájárultak a közös eredmények és a doktori értekezésem megszületéséhez. Itt nem tudom mindegyiküknek méltó módon kifejezni a hálámat, de néhányukat mindenképpen ki kell emelnem. Köszönöm Kékesi Katalinnak és Schlosser Gittának az inhibitorok tömegspektrometriás ellenőrzését, valamint Körtvély Elődnek és Szász Róbertnek az inhibitorok jellemzése során elvégzett színvonalas méréseket.

Köszönöm Családomnak, hogy gyerekkorom óta mindig azzal foglalkozhattam, amihez kedvem volt, és mindig mindenben támogattak. Külön köszönöm Édesanyámnak és Húgomnak, hogy az elmúlt években már bébiszitterként is számíthattunk rájuk, és élménydús délutánokat biztosítottak Ábrisnak, amíg mi Eszterrel dolgoztunk.

Szívből hálás vagyok Eszternek, amiért az élet minden területén mellettem áll, biztat és támogat, miközben Ábris és Lenke születése óta már nem csak a munkában, de gondoskodó anyaként is helyt áll. Kitartása és alázata nekem is sok erőt adott.

Bevezetés

Az ELTE Biokémiai Tanszékén Gráf László professzor indította el a szerin proteázok vizsgálatát a 80-as évek közepén, amit később kiterjesztettek a szerin proteázok és inhibitoraik kölcsönhatásainak kutatására is. Ez a munka a mai napig zajlik, az utóbbi időben leginkább témavezetőm, Pál Gábor kutatócsoportjában, aki nem csak folytatta a nagy hagyományokkal rendelkező téma kutatását, hanem a Magyarországon általa meghonosított, fágbemutatással történő irányított evolúciós módszertannal új lendületet is adott annak.

Az MTA Enzimológiai Intézetben Gál Péter és Závodszy Péter kutatócsoportja az elmúlt évtizedekben jelentős eredményeket ért el a komplementrendszer klasszikus és lektin útjának aktiválódásáért felelős szerin proteáz enzimek szerkezetének, működésének és biológiai szerepének mind pontosabb feltárásában.

A két kutatócsoport együttműködésre lépett a 2000-es évek derekán, aminek keretei között Kocsis Andrea kapta a feladatot, hogy a fágbemutatás alkalmazásával a világon elsőként fejlesszen ki a lektin utat specifikusan gátló molekulákat. Ennek érdekében az SFTI fehérjét (sunflower trypsin inhibitor) evolválta a lektin út iniciálásáért felelős MASP (Mannan-binding lectin [MBL]-associated serine protease) enzimekhez, a MASP-1-hez és a MASP-2-höz való kötésre. Erőfeszítéseit siker koronázta, és az eredmények arra is rámutattak, hogy a lektin út korábban felállított aktivációs modellje korrekcióra szorul.

Héja Dávid folytatta a munkát. Rá az a kihívás várt, hogy az Andrea által létrehozott molekuláknál hatékonyabb és szelektívebb MASP-1 és MASP-2 inhibitorokat fejlesszen. Ehhez egy másik inhibitor fehérjéből, az SGPI-2-ből (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor 2) indult ki. Dávid is sikerrel járt és az általa előállított monospecifikus inhibitorokkal végzett kísérletek a lektin út aktivációs modelljének helyesbítéséhez vezettek.

A komplementrendszer és azon belül a lektin út működésének részletes megismerése nem csak alapkutatási jelentőségű. A lektin út nemkívánatos aktivitása jelentős mértékben hozzájárul például a szívinfarktust vagy szélütést kísérő iszkémiás-reperfúziós szövetkárosodáshoz. Andrea és Dávid eredményei igazolták, hogy a MASP-1 és a MASP-2 egyaránt nélkülözhetetlen a lektin út aktiválódásához, ami ígéretes gyógyszercélpont molekulákká teszi ezeket az enzimeket. Ez egyben azt is jelenti, hogy a kifejlesztett lektin út inhibitorok maguk gyógyszerjelölt molekuláknak tekinthetők.

Doktori munkámat 2011-ben kezdtem meg és bekapcsolódtam a két csoport gyümölcsöző közös munkájába. Doktori munkám részben Andrea és Dávid munkája folytatásának is tekinthető. A lektin út inhibitorok fejlesztéséhez általuk használt kiindulási fehérjék nem-emberi eredetűek. A potenciális immunogén mellékhatások miatt ez hátrány lenne, amennyiben ezeket a molekulákat terápiás alkalmazásra továbbfejleszténék. Az egyik fő törekvésem az volt, hogy kifejlesszem a MASP-2 inhibitorok harmadik generációját egy emberi fehérjéből kiindulva. Ezek a molekulák az immunogén mellékhatások kisebb kockázatának köszönhetően a korábbi inhibitoroknál nagyobb terápiás potenciállal rendelkezhetnek.

Doktori munkám megkezdésekor a 2001-ben leírt MASP-3 enzimnek, a lektin út harmadik szerin proteázának még egyetlen fiziológiás szubsztrátja sem volt ismert, így az enzim szerepe azonosításra várt. Doktorandusz éveim alatt jelentek meg az első tanulmányok a témában, amelyek szerint a MASP-3 enzim a MASP-1 enzimmel közösen szerepet játszhat az alternatív út beindításáért felelős enzim, a D-faktor aktiválásában. Ez a kérdés később komoly vita tárgyát képezte az irodalomban. Mivel az emberi szervezetben nincs ismert MASP-3 gátlószer, másik fő célkitűzésem egy hatékony monospecifikus MASP-3 inhibitor kifejlesztése volt, amivel azonosíthatnánk a MASP-3 szubsztrátjait és ezáltal az enzim funkcióit.

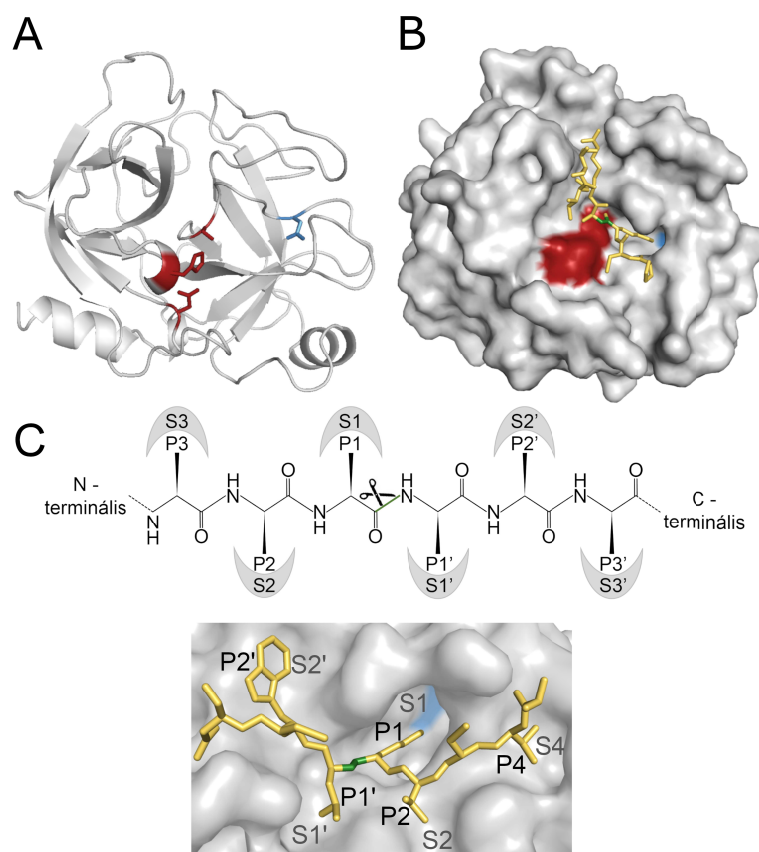
1. Irodalmi áttekintés

1.1. A szerin proteázok

A szerin proteázok nevüket a peptidkötés hidrolízisében kiemelt fontosságú szerin oldalláncról kapták. Szerin proteázok konvergens evolúciós folyamatok révén több útvonalon is létrejöttek és megtalálhatók az élővilág összes nagy rendszertani egységében (1). Katalitikus centrumukat leggyakrabban egy Ser-His-Asp oldalláncokból álló triád alkotja, ami az enzimek legalább négy nem-rokon csoportjára jellemző. Emellett leírtak más összetételű, szerin nukleofilt alkalmazó katalitikus diádokat és triádokat is. A MEROPS adatbázis (elérhető a <https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml> oldalon) (2) adatai szerint a szerin proteázok alkotják a fehérjebontó enzimek legnagyobb csoportját: a proteázok több mint harmada közéjük tartozik.

A szerin proteázok legnépesebb családja az S1, amelynek tagjait a típusenzim után kimotripszinszerű szerin proteázoknak is nevezik. Az S1 család a PA klánba tartozik, ami virális cisztein proteáz családokat is magába foglal (3). S1 proteázok katalizálják számos élettani folyamat kulcsfontosságú lépéseit. A táplálékfehérjék emésztése (kimotripszin, tripszin, elasztáz), a vérárvadás (fXIIa, fIXa, fXIa, fXa, fVIIa és trombin), a vérrögök oldása (plazminogén aktivátorok (tPA, uPA), plazmin) és egyes immunfolyamatok (pl. komplement válasz, citotoxikus T sejtek (granzyme B)) mind ilyen enzimek működésén alapulnak (1). Az S1 családba tartoznak a doktori munkám során vizsgált MASP (Mannan-binding lectin [MBL]-associated serine protease) enzimek is.

Az S1 szerin proteáz (serine protease, SP) domént két β -hordó alkotja (1A. Ábra). A β -hordók találkozásánál kialakuló árokba fekszik a szubsztrátok 6-8 aminosav hosszúságú szegmense, amelynek oldalláncai kapcsolatba lépnek az enzim felszínén lévő szubsztrátkötő zsebekkel. Ez a kiterjedt kölcsönhatás pozicionálja a katalitikus apparátus számára tökéletes helyzetbe a hasadó peptidkötést (1B,C. Ábra). A szubsztrátok vagy szubsztrátszerű proteáz inhibitor fehérjék enzimmel kölcsönható oldalláncait a Schechter-Berger nevezéktan (4) szerint a hidrolizált kötéstől az N-terminális felé P1-től, a C-terminális felé P1'-től számozzuk. Az enzim szubsztrátkötő zsebeit S-betűvel és a megfelelő, az adott zsebbel kölcsönható oldallánc számával jelöljük (1C. Ábra). Az enzim a P1-P1' peptidkötés hidrolízisét katalizálja.



1. Ábra - A szerin proteázok szerkezete és kölcsönhatása szubsztráttal vagy szubsztrátszerű inhibitorral

(A) A patkány anionos tripszin szerkezetének szalagmodellje. A katalitikus triádot alkotó oldalláncokat piros színnel ábrázoltam. Az enzim elsődleges szubsztrátspecifitását meghatározó, az S1 zseb alján található aszpartát oldalláncot kék színnel emeltem ki. (B) A patkány anionos tripszin felszíne. A szubsztrátkötő árkot egy szubsztrátszerű inhibitor fehérje P3-P3' szakasza foglalja el. Az enzim által hidrolizált peptidkötést zöld színnel jeleztem (C) A Schechter-Berger nevezéktan szerinti oldallánc-kötőzseb párok sematikus ábrán és egy konkrét enzim:inhibitor komplex példáján. Felhasznált szerkezetek: 3TGI (A,B), 3TVJ (C).

Az S1 kötőzseb meghatározó az enzim szubsztrátspecifitásának kialakításában. A szubsztrát hatékony hasításához fontos, hogy a P1 oldallánc és az S1 kötőzseb között előnyös kölcsönhatások alakuljanak ki. A tripszinszerű specifitású enzimek S1 zsebének alja egy aszpartát oldalláncnak köszönhetően negatív töltésű. Ennek megfelelően ezek az enzimek pozitívan töltött Lys vagy Arg P1 oldalláncok mellett hasítanak hatékonyan. A P1-S1 kölcsönhatás tehát kiemelt fontosságú, ugyanakkor sok enzimnek vannak preferenciái a P4-P4' szakasz más pozícióiban is. Bizonyos szubsztrátok nem csak az enzim szubsztrátkötő árkával kerülnek kölcsönhatásba, hanem attól távoli, úgynevezett exosite régiókhoz is kötnek.

A szerin proteázok egy része egyetlen SP doménből áll, sok más esetben viszont egy több domént tartalmazó fehérje rendelkezik SP doménnel is. Többdoménes proteázok, mint például a MASP-2 esetében akár más domén(ek) felszínén is lehet exosite régió a nagy fehérje szubsztrátok, mint például a C4 fehérje számára (5).

Az egyes szerin proteázok szubsztrátspecifitása és katalitikus aktivitása között hatalmas különbségek vannak. A hasnyálmirigy által termelt enzimek feladata a tápanyagfehérjék emésztése. Ezzel összhangban ezek az enzimek sokféle szubsztrátot képesek elhasítani, és katalitikus hatékonyságuk nagy. Ezzel szemben az ún. jelátviteli vagy szabályozó proteázok szubsztrátkészlete meglehetősen korlátozott, szubsztrátjaikat egy vagy kevés meghatározott pozícióban hasítják, és katalitikus hatékonyságuk általában kisebb.

A szerin proteázok fehérjebontó képessége veszélyeket is hordoz a szervezetre nézve. Ezért működésük szigorú, több szintű szabályozás alatt áll, aminek nem megfelelő működése betegségek kialakulásához vagy súlyosbodásához vezet (6–8). A szerin proteázok aktivitásának megfelelő mederben tartása érdekében szabályozható a génátíródás intenzitása, a proenzim aktiváció üteme és mértéke, az enzim aktivitása kofaktorok és inhibitorok által, valamint az enzim élettideje.

Különösen fontos az aktivitás szabályozásában, hogy a szerin proteázok csökkent aktivitású, sok esetben gyakorlatilag inaktív proenzimként (zimogénként) termelődnek. A zimogén aktivációja során az SP domén N-terminálisához közeli aktivációs peptidkötést egy másik proteáz molekula hasítja, amit az aktív forma kialakulását eredményező szerkezetváltozás követ (9). A hasítás után bizonyos esetekben az aktivációs peptid leválik, más esetekben viszont diszulfid hídon keresztül az SP doméhez kapcsolva marad. Ezekben az esetekben az aktivációs peptidnek, illetve többdoménes proteázok esetén az aktivációs peptidnek, és az általa az SP doménhez kapcsolt szomszédos doméneknek is meghatározó szerepük lehet az SP domén szerkezetének stabilizálásában és a teljes értékű enzim tulajdonságainak kialakításában (5, 10, 11).

A zimogén aktiválását legtöbbször egy már aktivált proteáz molekula végzi el. Erre példa az enterokináz általi tripszinogén aktiválás, vagy az aktív tripszin általi tripszinogén, kimotripszinogén és proelasztáz aktiválás. Ritkább esetekben viszont a zimogént aktiváló molekula maga is zimogén. Ezt a jelenséget zimogén általi zimogén aktiválásnak nevezzük. Ha a zimogén általi zimogén aktiválás két azonos fehérje között zajlik le, azt valódi autoaktivációnak nevezzük (12). Valódi autoaktivációra *in vivo* általában proteolitikus kaszkádok iniciációjáért felelős enzimek képesek, és a folyamat rendszerint allosztérikusan szabályozott. Erre példa a

XII-es faktor autoaktivációja a véralvadást és gyulladást eredményező kontakt-rendszer működésbe lépése során (13), illetve a C1r és a MASP-1 komplement proteázok felismerőmolekulák által szabályozott autoaktivációja (14, 15).

1.2. Szerin proteáz inhibitorok

A szerin proteázok szabályozásának a természetben gyakran előforduló módja az enzimek inhibitor fehérjékkel történő gátlása. A szerin proteáz inhibitorokat működési mechanizmusuk alapján három nagy csoportba sorolják: a szerpinek, a kanonikus és a nem-kanonikus inhibitorok (16, 17).

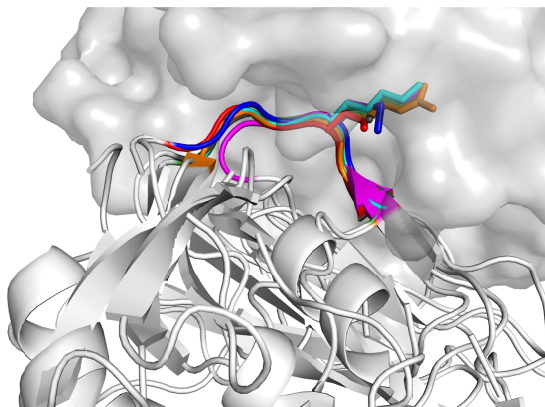
A szerpinek és az enzimek kölcsönhatása szubsztrátszerű. Az enzim elhasít egy, a szerpint által felkínált hurkot. A hurok hasadása szerkezetváltozást eredményez mindkét fehérjében, aminek során az enzim katalitikus apparátusa is torzul. Ez olyan kovalens enzim:inhibitor (acilenzim) komplex kialakulását eredményezi, aminek a hidrolízise az enzim torzult katalitikus apparátusa miatt gátolt, vagyis a szerpinek általi enzimgátlás praktikusán irreverzibilis. A vérplazma szerin proteázainak szabályozásában jelentős szerepük van a szerpineknek.

A nem-kanonikus inhibitorok többsége vérszívókból származik. Ezek a fehérjék az N-terminális régiójukkal létesítenek kiterjedt, de nem szubsztrátszerű kölcsönhatást az enzim szubsztrátkötő apparátusával és annak környékével. Ez megakadályozza az enzimet a szubsztrát fehérjék megkötésében és elhasításában. A nem-kanonikus inhibitorok legismertebb képviselője a piócából izolált, a trombinhoz kötődő, véralvadásgátló hatású hirudin.

Munkám során kanonikus inhibitorokkal dolgoztam, ezért ezeket részletesen bemutatom.

1.2.1. Kanonikus szerin proteáz inhibitorok és az enzim:inhibitor kölcsönhatás

A kanonikus inhibitorok a szerin proteáz inhibitorok legváltozatosabb és legnépesebb csoportja, amelyeknek konvergens evolúció révén legalább 17 családja alakult ki (17, 18). A különböző családokba tartozó inhibitorok térszerkezete alapvetően eltérő, ugyanakkor mindannyian rendelkeznek egy felszíni proteázkötő hurokkal. A kanonikus inhibitor elnevezés onnan ered, hogy az egyes inhibitorok rendkívül eltérő globuláris szerkezete ellenére a proteázkötő hurok térszerkezete mindig közel azonos, azaz kanonikus (2. Ábra)(17). Az inhibitor többi részének, az inhibitor vázszerkezetnek (angolul scaffold) az elsődleges szerepe a proteázkötő hurok konformációjának kialakítása és stabilizálása, ami az adott családra jellemző diszulfid hidak és / vagy egyéb másodlagos kölcsönhatások révén valósul meg.



2. Ábra - A kanonikus proteázkötő hurok szerkezete minden esetben közel azonos

Különböző családokba tartozó kanonikus inhibitorok (szalag) enzimmel (átlátszó felszín) alkotott komplexének szerkezetét illesztettem egymásra. A kanonikus proteázkötő hurok P3-P3' szakaszát különböző színekkel jelöltem és megjelenítettem az enzim S1 zsebébe nyomuló P1 oldalláncot. Az ábrán látható, hogy a különböző vázszerkezetű inhibitorok proteázkötő hurkának térszerkezete és a P1 oldallánc helyzete nagyfokú hasonlóságot mutat, míg a vázszerkezetek nem hasonlítanak egymásra. Felhasznált szerkezetek: 3D65, 1AZZ, 1TGS, 2G81, 3FP6, 1GL1, 4H4F.

A kanonikus inhibitorok a proteázkötő hurkon keresztül reverzibilisen kötnek az enzim szubsztrátkötő felszínéhez a P3-P3' szakaszon keresztül. Az inhibitor és az enzim között számos hidrogénhíd és egyéb kölcsönhatás alakul ki. Az inhibitor P3-P1 szakasza és az enzim 214-216 szegmense (kimotripszinogén számozás) között antiparallel β -redő jön létre (17). A P1 oldalláncnak az inhibitorok esetében is kitüntetett fontossága van. A P1 oldalláncnak az S1 zsebbel kialakított kölcsönhatásai az asszociációs energiának akár 70%-át is adhatják (17). A proteázkötő hurok enzimmel kölcsönható részlete hosszabb is lehet, illetve részt vehet a kölcsönhatásban a kanonikus huroktól távoli másodlagos kötőfelszín is.

A kölcsönhatás tehát alapvetően szubsztrátszerű, a kanonikus inhibitorok mégis a szubsztrátoktól eltérően viselkednek. Az enzim és az inhibitor asszociációját a P1-P1' peptidkötés lassú hidrolízise követi, ami nem eredményezi az inhibitor inaktiválódását. A kanonikus hurok és az inhibitor váz között, valamint a kanonikus hurok és az enzim között kialakuló kölcsönhatásoknak köszönhetően a hasított inhibitor konformációja és affinitása szinte változatlan. Az új N-terminális megfelelő orientációban marad, ezért az enzim a P1-P1' peptidkötés reszintézisét is katalizálja (19, 20). Az ép és a hasadt inhibitor forma között egyensúly áll be, a folyamat egyensúlyi állandója inhibitoronként eltérő, de gyakran egyhez közeli. A kanonikus inhibitorok hatásmechanizmusát standard mechanizmusnak, vagy a jelenség leírója, Michael

Laskowski után Laskowski-mechanizmusnak nevezik, és a következő egyszerűsített sémával lehet bemutatni:



Ahol E az enzim, I az inhibitor, I* a hasadt inhibitor, EI és EI* pedig az enzim komplexe ép, illetve hasadt inhibitorral (21).

A P1-P1' kötés hidrolízisének lassú volta miatt az enzim:inhibitor kölcsönhatás hosszú első fázisában az enzim és a hasítatlan inhibitor látszólagos egyensúlyba kerül az enzim:inhibitor komplexszel. A rendszer csak napok vagy hetek alatt éri el a végleges termodinamikai egyensúlyt. Ebben az első, látszólagos egyensúlyi állapotban meg lehet határozni az enzim:inhibitor komplex disszociációs állandóját (K_D), amit az inhibitorok hatékonyságának jellemzésére használnak, és amit egyensúlyi inhibíciós állandónak (K_I) is neveznek:

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Ahol [E] a szabad enzim, [I] a szabad inhibitor, míg [EI] az enzim:inhibitor komplex moláris koncentrációja.

A szerin proteázok és a kanonikus szerin proteáz inhibitorok kölcsönhatása a fehérje-fehérje felismerés egyik legtöbbet tanulmányozott modellje. A korai kísérletek során jól hozzáférhető, nyitott szubsztrátkötő árokkal rendelkező emésztőenzimek kölcsönhatásait vizsgálták. Röntgenkristallográfiás kísérletekben azt tapasztalták, hogy a szabad fehérjék és a komplexben lévő fehérjék kristályszerkezete szinte teljesen megegyezett, a kölcsönhatás során a fehérjéknek nem kellett egymáshoz idomulniuk (21). Ezért ezeket az interakciókat a kulcs-zár modell (22) mintapéldájának tekintették.

Az utóbbi évtizedekben az erről alkotott kép sokat finomodott. A jelátviteli proteázok esetében a szubsztrátkötő árok nem hozzáférhető, hanem felszíni hurkokkal blokkolt. Ezeknek a hurkoknak el kell mozdulniuk a kölcsönhatás során, vagyis nem érvényesülhet a kulcs-zár modell. Az inhibitor szerkezete is megváltozhat a komplex kialakulása során. Például a MASP-2 enzim fágbemutatással fejlesztett MASP-2 inhibitorral, SGMI-2-vel (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor 2 [SGPI-2]-based MASP-2 inhibitor) alkotott komplexében (PDB: 3TVJ) mind az enzim, mind az inhibitor térszerkezete jelentősen módosult a szabad formák szerkezetéhez képest (23).

Szerkezetvizsgáló és kinetikai módszerekkel szerin proteázok (24, 25) és kanonikus inhibitorok (26) esetében is kimutatták, hogy a fehérjék oldatban konformációs sokaságként

vannak jelen, és a lehetséges állapotoknak csak egy része alkalmas a partnerrel való kölcsönhatásra. Bár a szerin proteázok többségének kölcsönhatásait a konformációs szelekció modellje jellemzi (27), a komplementrendszer D-faktor nevű enzime és a C3bB szubsztrát kölcsönhatását az indukált illeszkedés modell egy speciális változatával (28) lehet legjobban leírni.

1.2.2. A vázszerkezet függetlenség

A szerin proteázok és kanonikus inhibitoraik kölcsönhatását évtizedeken keresztül vizsgálták behatóan az amerikai Purdue egyetemen Michael Laskowski kutatócsoportjában. A később Laskowskiról elnevezett kölcsönhatási mechanizmus feltárása mellett foglalkoztak az inhibitorok specificitását és affinitását meghatározó törvényszerűségek kutatásával is. Az általuk megfogalmazott modell szerint a kanonikus inhibitorok specificitása a vázszerkezettől független, azt kizárólag az inhibitor hurok szekvenciája határozza meg (29, 30).

A modell megfogalmazásához vezető kísérletek során elsősorban a Kazal családba tartozó természetes inhibitorok (31) és Kazal inhibitorok P1 pozícióban mutációt hordozó változatainak (32, 33) enzimgátló tulajdonságait vizsgálták, majd később bevonták a vizsgálatokba egy másik családba tartozó inhibitor, az eglin C P1 variánsait is (29).

A Kazal inhibitorokra vonatkozóan azt állapították meg, hogy az esetek nagy részében az azonos P1 aminosav helyettesítés következtében azonos mértékben változik meg egy adott enzimmel való kölcsönhatás standard asszociációs szabadenergia változás (ΔG_a°) értéke, vagyis a mutáció hatására bekövetkező $\Delta\Delta G_a^\circ$ értékek azonosak. Ezt a jelenséget nevezték el családon belüli additivitásnak (angolul intrascaffolding additivity). Hasonló eredményeket kaptak a különböző családokba tartozó inhibitorok P1 pozíciójának vizsgálata során is. Ezt a jelenséget vázszerkezetek közti additivitásnak (angolul interscaffolding additivity) nevezték el (29), amit egyszerűsítve vázszerkezet függetlenségnek nevezünk.

A Laskowski csoport kísérleteinek túlnyomó része a P1 pozícióra korlátozódott és ők is megfigyelték, hogy családon belül gyakrabban teljesül az additivitás, mint családok között. Az inhibitor hurok konformációjának rendkívüli hasonlóságára és az inhibitorok azonos hatásmechanizmusára alapozva mégis kiterjesztették a vázszerkezet függetlenség elméletét a kanonikus hurok összes pozíciójára és a kanonikus inhibitorok összes családjára (29). A vázszerkezet szerepével kapcsolatban azt állapították meg, hogy az kimerül az inhibitor hurok stabil kanonikus térszerkezetének biztosításában (30).

Később bevonták a vizsgálatokba a Kunitz családot és a P1' pozíciót is, és számos esetben nem-additív viselkedést találtak (34, 35). Megfigyelték azt is, hogy a vázszerkezettől függetlenül ugyanakkora hatással járó aminosavcserék száma annál nagyobb, minél hasonlóbb a kanonikus hurkok térszerkezete (34). Mindezek ellenére a nem-additív eseteket kivételekként tárgyalták, és nem vontak le a vázszerkezet függetlenség általános érvényét megkérdőjelező következtetést.

Laboratóriumunk eredményei több esetben ellentmondtak a családon belüli additivitás (36) és a vázszerkezet függetlenség (23, 37) modelljeinek. Ez arra készítetett minket, hogy megvizsgáljuk a vázszerkezet függetlenség érvényességét egy, az egész hurokra kiterjesztett kísérletsorozatban. Kimutattuk, hogy az adott enzim gátlásához optimális inhibitor hurok szekvencia különböző inhibitor vázszerkezetek esetén eltérő, vagyis a vázszerkezet függetlenség nem általános érvényű (38). Doktori munkám során a vázszerkezet függetlenség modelljét célzottan nem vizsgáltam, de fontosnak tartottam, hogy az eredményeket ennek a kérdéskörnek a szempontjából is elemezzem.

1.3. A komplementrendszer

A komplementrendszerrel kapcsolatos első megfigyeléseket még a 19. század második felében tették az immunológia úttörői, köztük Fodor József magyar orvosprofesszor. Leírták, hogy egészséges állatok vérében nincsenek baktériumok, illetve a mesterségesen a vérbe juttatott baktériumok is gyorsan eltűnnek, elpusztulnak. Később kémcsőben is igazolták a vér, illetve vérsavó baktériumölő képességét, ami hőkezelés hatására megszűnt. Bordet mutatta ki, hogy a vérben léteznek specifikus, az egyes antigéneket célzottan felismerő antitestek, és egy nem-specifikus, hőkezelésre érzékeny faktor is, ami csak akkor képes kifejteni antibakteriális hatását, ha specifikus antitestek is jelen vannak. A komplement elnevezést Ehrlich és Morganroth vezette be arra utalva, hogy a hőérzékeny nem-specifikus faktor aktiválódása az antitestek specifikus antigénfelismerésen alapuló hatását egészíti ki.

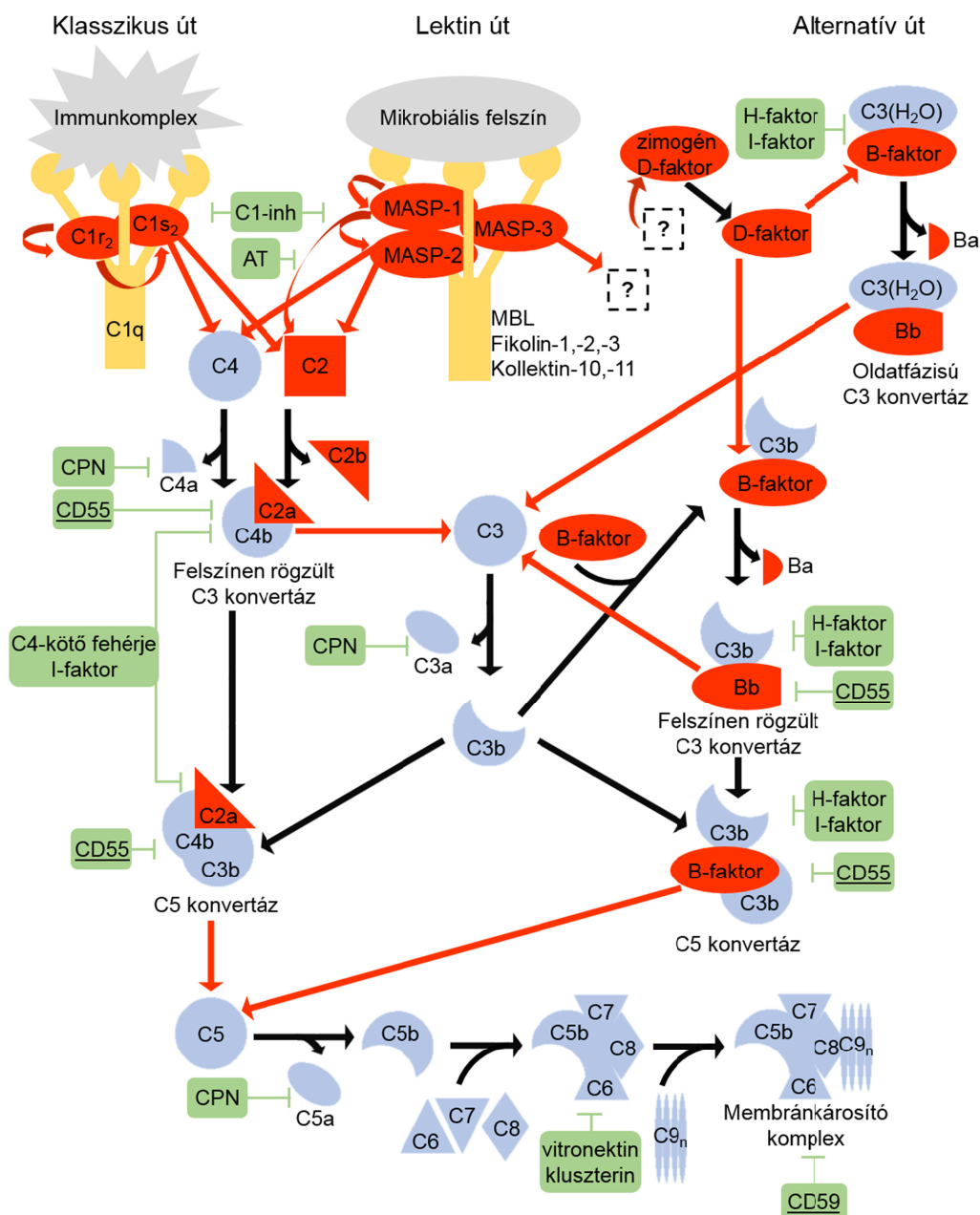
Az azóta eltelt több mint 100 év során a komplementrendszerhez tartozó fehérjék tucatjait írták le és folyamatosan bővült tudásunk a rendszer felépítéséről és működéséről, aktivációs mechanizmusairól, fiziológiás és betegségekben játszott szerepéről. Kiderült, hogy a komplementrendszer szerepe messze több annál, mint hogy az antitesteken alapuló immunválaszt kiegészítve növeli a baktériumok pusztításának hatékonyságát. Mai tudásunk szerint a komplementrendszer egy ~50 tagú, vérben keringő oldott komponensekből, valamint sejtfelszíni receptorokból és regulátorokból álló összetett fehérjehálózat (3. Ábra), a veleszületett immunitás

fontos pillére. A komplementrendszernek szerteágazó szerepe van az immunhomeosztázis fenntartásában: az antitestekre épülő védő funkciója mellett azonnali, antitestektől független védelmet is biztosít a szervezetnek sokféle patogén mikroorganizmussal szemben, valamint hozzájárul gyulladásos folyamatokhoz, részt vesz az immunkomplexek és apoptotikus sejtek eltávolításában, és több ponton is hidat képez a veleszületett és az adaptív immunválasz között (39–41).

1.3.1. A komplementrendszer felépítése

A komplementrendszer komponensei nyugvó állapotban vannak jelen a vérben, aktiválódásukhoz valamilyen veszélyre utaló jelre, nem-saját vagy megváltozott-saját struktúrák felismerésére van szükség. A rendszer aktiválódása három aktivációs úton, a klasszikus, a lektin és az alternatív/properdin úton keresztül következhet be (3. Ábra). A három útvonal közös vonása, hogy a rendszer aktiválódását kiváltó molekuláris jel felismerését követően az adott útvonalra jellemző szerin proteáz zimogének kaszkádszerű aktivációja következik be. A keletkező aktív proteázok további komplement komponensek hasítása révén mindhárom útvonalon C3 konvertáz komplexeket hoznak létre. A C3 konvertáz komplexek létrejöttét követően a komplement aktiváció egy központi kaszkádba torkollik, ami a komplement válasz nagyfokú felerősítéséhez és a rendszer effektor funkcióinak megjelenéséhez vezet.

Az aktivációt előidéző felszínre rakódó komplement komponensek megjelölik azt az immunrendszer sejtjei számára (opszonizáció), míg a felszabaduló kisebb fragmentumok gyulladást előidéző anafilatoxinok. A komplement aktiváció utolsó lépéseként kialakul a membránkárosító komplex (membrane attack complex, MAC), egy, a sejtmembránban összeálló pórus, ami a komplement által felismert és megtámadott sejt elpusztulását eredményezheti. A komplementrendszer lenyűgöző tulajdonsága, hogy aktivitása úgy vezet a kórokozó megjelöléséhez, esetleges elpusztításához, helyi gyulladásához és immunsejtek toborzásához, hogy ahhoz nincs szükség sejtek aktív közreműködésére.



3. Ábra - A komplementrendszer sematikus ábrája

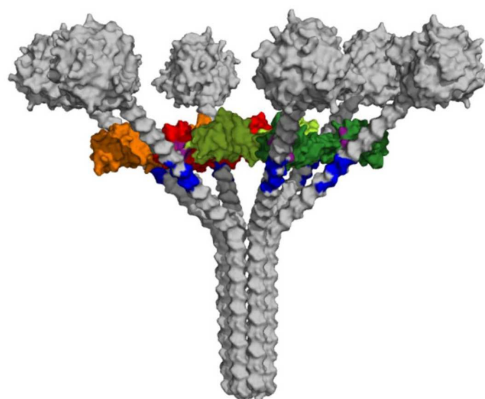
Az ábrán pirossal jelöltem a komplementrendszer szerin proteáz komponenseit és késsel az egyéb komponenseket. A komplement aktivitás szabályozásáért felelős, a 1.3.5. fejezetben említett fehérjék egy részét is feltüntettem az ábrán, zöld színnel. A komplement aktiváció proteolitikus hasítással járó lépéseit piros nyilakkal jelöltem. A membránfehérjéket a szolubilis fehérjéktől a nevük aláhúzásával különböztettem meg. Doktori munkám kezdetekor a MASP-3 szubsztrátja és a D-faktor aktivátora azonosítatlan volt, ezt az ábrán kérdőjelekkel jeleztem.

1.3.2. A komplementrendszer aktiválódási útvonalai

A klasszikus út és a központi komplement kaszkád

A klasszikus út elsősorban IgG-t és IgM-et tartalmazó immunkomplexek felismerését követően aktiválódik, és tulajdonképpen a komplement korai megfigyelései során azonosított, az antitestek működését kiegészítő védelmi rendszernek felel meg (3. Ábra). Ma már tudjuk, hogy a klasszikus út is képes antitestektől függetlenül működésbe lépni, például a C-reaktív fehérje közvetítésével. A klasszikus útnak fontos szerepe van az immunkomplexek és apoptotikus sejtek eltávolításában (42), részt vesz a felesleges szinapszisok eliminálásában az egyedfejlődés során (43) és számos más folyamatban is (44).

A klasszikus út aktiválódását eredményező jel felismeréséért a C1 komplex felel, annak is a C1q egysége. A C1q egy tulipáncsokorra emlékeztető szupramolekuláris komplex, ami hat heterotrimer alegységből áll. Az alegységek kollagénszerű szárai diszulfidhidakon és más kölcsönhatásokon keresztül alakítják ki a komplex szárát, míg a globuláris domének felelősek az immunkomplexekhez való kötődésért (4. Ábra).



4. Ábra - A C1 komplex szerkezetének modellje

A C1q felismerő molekula (szürke) és a hozzá kötött C1r (sötétzöld és narancs) és C1s (világos zöld és piros) szerin proteázok N-terminális fragmentumainak modellje. A szerin proteázok felszínén lévő kötőhelyeket lila, míg a C1q szárain lévő kötőhelyeket kék szín jelzi. Az ábra Phillips és munkatársai közleményéből (45) származik.

A C1q száraihoz egy kétféle szerin proteáz zimogénből álló, C1s-C1r-C1r-C1s felépítésű heterotetramer kapcsolódik. A C1r és C1s fehérjék harmadlagos szerkezetét azonos moduláris felépítés jellemzi: öt nemkatalitikus domént követő C-terminális SP doménnel rendelkeznek (15). Az immunkomplexhez való kötés a C1q konformációjának megváltozását eredményezi, aminek

következtében a C1r autoaktiválódik, majd az aktív C1r aktiválja a C1s enzimet. Az aktív C1s célzott hasítással aktiválja a C4 és C2 komponenseket.

A C4 fehérje tartalmaz egy reaktív tioészter csoportot, ami lehetővé teszi, hogy a hasítást követő konformációváltozások után a molekula nagyobbik fragmentuma (C4b) kovalensen kapcsolódjon a felszínhez. A C2 egy szerin proteáz, ami a felszínhez kapcsolt C4b molekulához köt, majd a C1s általi hasítás következtében aktiválódik (C2a). Az így létrejövő C4b2a komplex képes elhasítani a központi komplement komponenst, a C3-at, vagyis ez egy C3 konvertáz. A C3 fehérje a C4-hez hasonlóan szintén reaktív tioészter csoportot tartalmaz, és a konvertáz általi hasítást követően a C3 molekula nagyobbik fragmentuma (C3b) is kovalensen kapcsolódik a felszínhez.

A C3b keletkezése és felszínhez kapcsolódása a komplement aktiválódás kulcsmomentuma, egyben a három aktivációs útvonal találkozási pontja. Ezen a ponton lép a komplement aktiváció a központi kaskád szakaszába. Amikor a keletkező C3b egy C4b2a C3 konvertázhoz kapcsolódik, akkor annak specificitását a C5 komponens irányába módosítja. Vagyis a C4b2a C3 konvertázból kialakul egy C4b2a3b összetételű C5 konvertáz.

A C5 komponens hasadásával keletkező C5b képezi az alapját a membránkárosító (MAC) komplexnek. A C5b C6 és C7 komponenst köt. A kialakuló C5b-7 komplex képes beépülni a membránba, majd egy C8 és több C9 fehérjét megkötni. Az így kialakuló MAC (C5b-9) egy kb. 100 nm átmérőjű pórus, ami a komplement által megtámadott sejt lízisét eredményezheti.

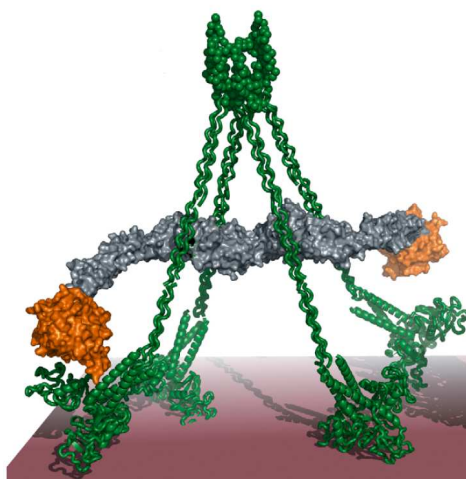
Az aktivációs folyamat során keletkező C3a és C5a termékek anafilatoxinok, amik fontos szerepet játszanak a komplement aktiválódás helyén kialakuló gyulladásos folyamatokban és immunsejtek toborzásában. Az aktiváló felszínre kovalensen lerakódó C3b és C4b termékek opszoninként is szolgálnak, vagyis növelik a megjelölt struktúrák immunsejtek általi felismerésének és bekebelezésének hatékonyságát.

A lektin út

A lektin út a komplementrendszer legkésőbb azonosított aktiválódási útvonala (46). A lektin út antitestektől független, azonnali védelmet biztosít a szervezet számára a patogén mikrobákkal szemben. Felépítése és aktivációs mechanizmusa hasonlít a klasszikus útra, de alapvető eltéréseket is mutat, működése összetettebb (3. Ábra).

A klasszikus út egyetlen, jól definiált felismerő komplexével szemben a lektin út működésbe lépésében legalább hatféle mintázatfelismerő molekula (pattern recognition molecule, PRM)

játszik szerepet (47). Ezek térszerkezete hasonlít a C1q-ra: C-terminális felismerő doménből és N-terminális kollagén szárból állnak (5. Ábra). Alegységeik a C1q-tól eltérően nem heterotrimerek, hanem homotrimerek. Szintén különbség a C1q-hoz képest, hogy amíg a C1q mindig hat trimer alegységből áll össze, addig a lektin út felismerő molekuláinak oligomerizációs foka változó. A tetramer forma a leggyakoribb, de dimerektől hexamerekig fordulnak elő különböző oligomerek. A lektin út felismerő molekulái patogénekre jellemző felszíni szénhidrát mintázatokat ismernek fel. A legkorábban felfedezett és legjobban jellemzett felismerő molekula, a mannózkötő lektin (mannose-binding lectin, MBL), ami mannóz, glükóz, fukóz, N-acetil-mannózamin és N-acetil-glükózamin csoportokhoz kötődik. A fikolin M, L és H molekulák (másik nomenklatura szerint fikolin-1,-2 és -3) fibrinogénszerű doménjeiken keresztül különböző acetilált csoportokat ismernek fel. A kollektin-10 (CL-L1) ligand specificitása az MBL-éhez nagyon hasonló, míg a kollektin-11 (CL-K1) többek között terminális D-mannóz egységekhez kapcsolódik. Ezek a fehérjék vegyes, CL-LK komplexeket alkotnak.



5. Ábra - Az MBL:MASP komplex szerkezetének modellje

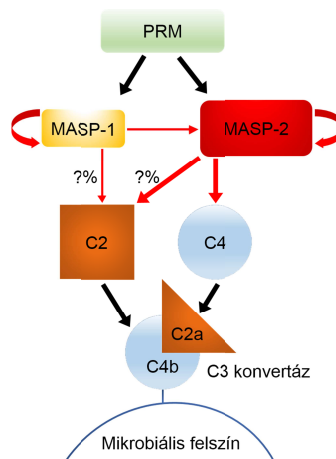
Az ábrán egy MASP dimerrel (szürke-narancs) asszociált tetramer MBL komplex (zöld) negyedleges szerkezetének modellje látható, amely az egyes alkotók röntgenkristallográfiás szerkezete, valamint kisszögű röntgenszórás mérések alapján készült. A MASP molekulák nemkatalitikus doménjei szürkék, SP doménje narancsszínű. A MASP-ok Ca^{2+} -függő módon, dimerként kapcsolódnak a felismerő molekulához. Egy MBL dimerhez egy MASP dimer kapcsolódhat, a trimer vagy magasabb oligomerizációs fokú felismerő molekulák akár két MASP dimert is hordozhatnak. Az ábra Bajic és munkatársai (48) közleményéből származik.

A mintázatfelismerő molekulákhoz kötődő fehérjék tekintetében is igaz, hogy a lektin út a klasszikus útnál változatosabb. A lektin út aktiválásáért a felismerő molekulákhoz dimer formában

kapcsolódó, a C1r és C1s enzimekkel megegyező moduláris szerkezetű MASP-1 és MASP-2 enzimek (15) felelnek C4 és C2 hasításon keresztül. A lektin út aktiválódása tehát a klasszikus úttal azonos összetételű C3 konvertáz keletkezésével jár. A két útvonal bármelyikén bekövetkező aktiválódás a C3 konvertáz keletkezésétől kezdve azonos lépéseken keresztül halad tovább (3. Ábra).

A lektin út vizsgálatának kezdetén az elsőként felfedezett MASP-1 proteáznak tulajdonították a C4 és C2 hasítás képességét (49), amit így teljesértékű komplementaktiváló enzimnek tekintettek. Később derült fény arra, hogy a C4 hasításért kizárólag a preparátumokban kis mennyiségben megtalálható, később felfedezett MASP-2 felel (50). Bár a MASP-1 viszonylag nagy koncentrációban van jelen a szérumban (143 nM, 11 µg/mL) (51), képes valódi autoaktivációra (52) és C2 hasításra, a C4 hasítás hiánya miatt önállóan mégsem képes a lektin útvonalat beindítani (53). Ezzel szemben az alacsony koncentrációjú MASP-2 (6 nM, 0,4 µg/mL) (51), ami izolált enzimen végzett kísérletek alapján szintén képes valódi autoaktivációra (12, 52), és C2 hasításra, a C4 hasítására is képes, így széles körben elfogadottá vált, hogy önmagában képes aktiválni a komplementrendszer.

A MASP-1 szerepének pontosítását célzó kutatások során MASP-1^{-/-} egér szérummal, illetve MASP-1 depletált emberi szérummal végzett kísérletek alapján japán és dán kutatók azt fogalmazták meg, hogy a MASP-1 hozzájárul ugyan a lektin út aktivációjához, de szerepe nem esszenciális (54, 55). Ezen információk ismeretében tehát kialakult a lektin út aktivációjának az a modellje, ami szerint a patogén felismerését követően a PRM komplexhez kötött MASP-2 autoaktivációja, C2 és C4 hasítása a meghatározó a komplement aktiváció szempontjából. A MASP-1-nek kiegészítő, erősítő szerepet tulajdonítottak, ami MASP-2 aktiváláson és C2 hasításon keresztül valósul meg (6. Ábra). Ezt a modellt azóta kutatócsoportjaink korrigálták (56). Ezeket az eredményeket a doktori munkám közvetlen előzményeit és motivációját bemutató fejezetben ismertetem (2.1. Fejezet).



6. Ábra - A lektin út aktiváció modellje a 2000-es évek elején

A modell szerint a MASP-2 a lektin út autoaktivációra, C4 és C2 hasításra képes, autonóm aktivátora. A MASP-1 kiegészítő, támogató, erősítő szereppel bír. A piros nyilak proteolitikus hasítást jeleznek. (Héja és munkatársai (56) nyomán, módosítva.)

A MASP-1 és MASP-2 enzimek mellett a mintázatfelismerő molekulákhoz még háromféle fehérje köthet. A 2001-ben leírt MASP-3 (57) a MASP-1 enzimet is kódoló gén terméke, alternatív splicing révén keletkezik. A MASP-3 öt N-terminális doménje a MASP-1 enzimmel közös, de egyedi C-terminális SP doménnel rendelkezik. Szérumkoncentrációja viszonylag magas (63 nM, 5 µg/mL)(51), de sokáig nem sikerült kimutatni, hogy hasítaná bármelyik komplement komponenst. Érdekesség, hogy a MASP-3 enzimet egyik, a komplement szerin proteázok aktivitását szabályozó inhibitor sem gátolja. A MASP-3 szerepével kapcsolatban kialakult elképzelés szerint a fehérje a lektin út negatív szabályozója azáltal, hogy kötődik a mintázatfelismerő molekulához, amivel megakadályozza a MASP-1 és MASP-2 enzimek kötődését, miközben egyetlen komplementfehérjét sem hasít (57).

Később kiderült, hogy a MASP-3 fehérje szerepet játszik az egyedfejlődésben. Az enzim hiányát vagy inaktivitását eredményező mutációk állnak a 3MC szindróma nevű, fejlődési rendellenességekkel járó ritka genetikai betegség hátterében (58–61). Ez rámutat arra, hogy a komplementrendszernek vagy egyes komplementfehérjéknek nem csak az immunhomeosztázis fenntartásában lehet jelentőségük.

A MASP-3 szerepével kapcsolatos első feltételezés nem adott magyarázatot arra, hogy miért őrizte meg az evolúció a fehérje proteolitikus aktivitását, ha annak a lektin út negatív szabályozásában nincsen szerepe. A második megfigyelés pedig nem ad magyarázatot arra, hogy

az egyedfejlődés során fontos szereppel bíró enzim miért termelődik jelentős mennyiségben felnőttekben is. A kérdés megválaszolásában nagyon hasznos eszköz lett volna egy specifikus MASP-3 inhibitor, azonban ilyen molekula a természetből nem ismert. Számos kutatócsoport igyekezett azonosítani a MASP-3 fiziológiás fehérje szubsztrátjait, hogy ezáltal azonosítsák az enzim szerepét. Ezeknek a kutatásoknak az eredményeit, illetve kutatócsoportjaink ezirányú korábbi hozzájárulásait a doktori munkám előzményeit és problémafelvetéseit tárgyaló fejezetben mutatom be (2.2. Fejezet).

A három MASP enzim mellett a lektin út PRM komplexeihez még két, proteáz doménnel nem rendelkező fehérje is kapcsolódhat. A MAP19 (sMAP, MAP-2) a MASP-2-vel közös génről íródik át alternatív splicing révén (62), míg a MAP44 (MAP-1) a MASP-1-et kódoló gén terméke (63). A MASP-3 esetével analóg módon ezekről a fehérjékről is azt feltételezik, hogy a MASP enzimekkel a PRM-kötésért versengve negatívan szabályozzák a lektin utat.

Az alternatív út

Az alternatív út felépítése és működése alapvetően eltér a klasszikus és lektin útnál leírtaktól: folyamatos, alacsony szintű aktiválódással tesztel a szervezetben minden felszínt, de csak olyan, tipikusan nem-saját felszíneken aktiválódik eredményesen, amelyeket nem védelmeznek komplement szabályozó fehérjék. Ennek a „tick-over”-nek elnevezett jelenségnek a feltételezett mechanizmusa a következő (3. Ábra).

A C3 komponens tioészter csoportja nem csak C3 konvertáz általi hasítás után kerülhet a molekula felszínére, hanem konformációs fluktuációk következtében is, ami a reaktív tioészter hidrolízisével jár. Az így létrejövő C3(H₂O) molekula konformációja hasonlít a proteolitikusan aktivált formához, ezért a C3(H₂O) megköti a B-faktor szerin proteáz zimogént. A C3(H₂O)B komplexhez köt az alternatív út másik szerin proteáza, a D-faktor, aktiválja a B-faktort, majd disszociál. Így keletkezik az oldatfázisú C3(H₂O)Bb C3 konvertáz. A modell szerint a kis koncentrációban keringő oldatfázisú C3 konvertázok aktivitása folyamatos C3b keletkezéssel jár. A felszínhez közel keletkező C3b a reaktív tioészter és a felszínen lévő amino vagy hidroxil csoport reakciója következtében kovalensen rögzülhet. A felszínen megkötött C3b-hez B-faktor kapcsolódhat, amit a D-faktor aktivál, így jön létre az alternatív útra jellemző felszíni C3bBb C3 konvertáz. A C3 konvertázok által aktivált és a felszínre lerakódott C3b molekulák újabb C3 konvertázok alapjául szolgálhatnak. Ettől a ponttól kezdve az alternatív út pozitív visszacsatolási hurokként működik (64, 65), és jelentős erősítést biztosít a komplement válasznak függetlenül

attól, hogy az első C3 konvertázok a klasszikus úton, a lektin úton vagy a tick-over mechanizmus révén keletkeztek. (66). Ez mutatja, hogy az alternatív út kulcsfontosságú a hatékony komplement válasz kialakulása szempontjából.

Az eddig leírtak szerint az alternatív út működéséhez nincs szükség mintázatfelismerő molekulára. Régóta ismert, hogy a properdin nevű fehérje képes stabilizálni a C3bBb C3 konvertázt, és a konvertázok életidejének növelésén keresztül fokozza a komplement választ. Az elmúlt években olyan, az irodalomban erősen vitatott eredményeket is közöltek, amelyek szerint a properdinnek mintázatfelismerő szerepe lehet, vagyis nem a kialakult konvertázhoz köt, hanem maga azonosítja a felszínt célpontként a komplementrendszer számára (67). Ez alapján úgy is lehet tekinteni, hogy létezik egy tick-over mechanizmuson alapuló alternatív útvonal és egy, a properdin mintázatfelismerő tulajdonságán alapuló properdin útvonal is (67).

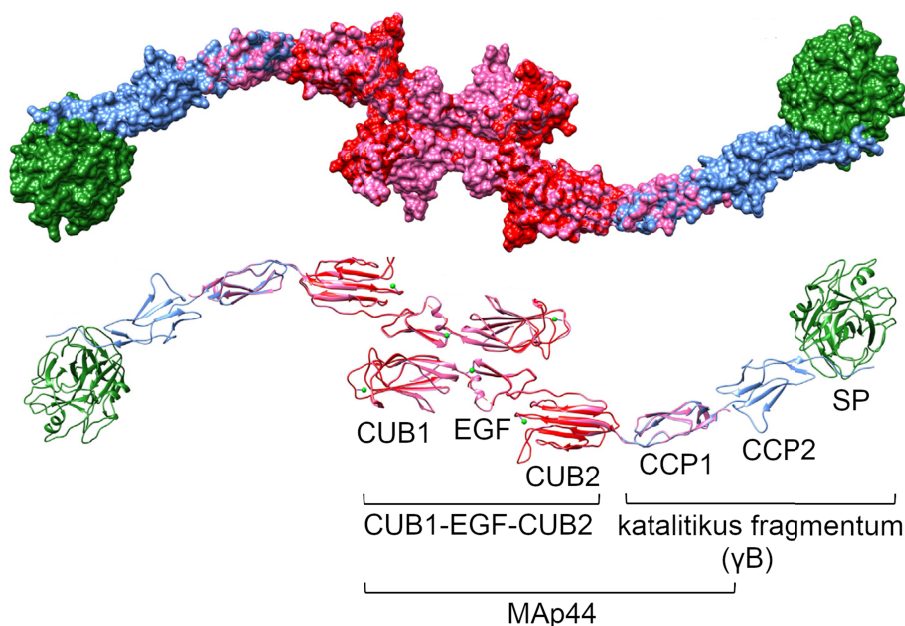
Az egészséges saját sejtek számára védettséget biztosít, hogy egyrészt kis hatékonysággal rakódik le a felszínükre C3b, másrészt a lerakódott komplement komponenseket sejt felszíni komplement regulátor fehérjék inaktíválják, eltávolítják (lásd később, a komplementrendszer szabályozásáról szóló 1.3.5. fejezetben). A kórokozók zöme nem rendelkezik ilyen védelemmel, ezért a C3b lerakódik a felszínükre és beindítja az alternatív út által biztosított pozitív visszacsatolási hurkot, ami a felszín C3b-vel való telítődését, a központi komplement kaszkád aktiválódását és membránkárosító komplexek kialakulását eredményezi.

1.3.3. A MASP enzimek és a D-faktor szerkezete

A komplementrendszer működésében összesen kilenc szerin proteáz (C1r, C1s, MASP-1,-2,-3, C2, B-faktor, D-faktor, I-faktor) vesz részt. Az egyetlen SP doménből álló D-faktor kivételével C-terminális katalitikus doménjüket megelőzi több nemkatalitikus domén (15). Ezek az enzimek tipikus szabályozó proteázok, mivel szubsztrátkészletük kevés fehérjére korlátozódik, és katalitikus aktivitásuk az emésztőenzimekhez viszonyítva alacsony.

A MASP enzimek a C1r/C1s/MASP családba tartoznak. Ezeket a fehérjéket hat domén alkotja (68) (7. Ábra). Az N-terminális három domén (CUB1-EGF-CUB2) mindegyike Ca^{2+} -ionokat köt és a fehérjék Ca^{2+} -függő dimerizálódásában, valamint a felismerő molekulához való, szintén Ca^{2+} -függő kötésében van szerepük. A C-terminális SP domént megelőzően két CCP domén (CCP1-CCP2) található, amelyek a SP domén stabilizálásával és a nagy fehérje szubsztrátok megkötését segítő exosite régiók biztosításával járulnak hozzá az enzim szubsztrátspecifitásának és katalitikus aktivitásának kialakításához (5, 11). Az aktivációs peptidkötés hasadását követően a

nemkatalitikus domének és az aktív SP domén egy diszulfid híd által összekapcsolva marad. A CCP1-CCP2-SP felépítésű fragmentum tartalmaz minden szubsztráttal kölcsönható felszínt és katalitikusan egyenértékű a teljes hosszúságú molekulával (10, 14, 69), ezért az *in vitro* kísérletekhez általában ilyen rekombináns, γ B-nek is nevezett katalitikus fragmentumokat használunk. Ebbe a fehérjecsaládba tartozik a C1r, C1s, MASP-1,-2,-3 enzimek mellett a MAp19 (sMAP) és a MAp44 (MAP-1) fehérje. Az MAp19 a MASP-2-t kódoló gén alternatív splicing révén keletkező terméke, és a MASP-2 CUB1-EGF fragmentumának felel meg. A MAp44 a MASP-1-et és MASP-3-at is kódoló gén terméke, az enzimek CUB1-EGF-CUB2-CCP1 fragmentumával szinte teljesen megegyezik.



7. Ábra - A teljes hosszúságú MASP-1 szerkezetének modellje

A modell a MASP-1 három átfedő fragmentumának kristályszerkezetéből készült azok egymásra illesztésével. Ezek a fragmentumok a CUB1-EGF-CUB2 (piros), az MAp44 (rózsaszín) és a katalitikus fragmentum (γ B, kék és zöld). Az ábrán zöld gömbök jelölik a CUB1-EGF-CUB2 domének által megkötött Ca^{2+} -inokat. Az ábra Dobó és munkatársai közleményéből (70) származik, módosításokkal. Az ábrán használt rövidítések: CUB: C1r/C1s, tengeri sünn Uegf, bone morphogenetic protein-1; EGF: epidermal growth factor; CCP: complement control protein

A D-faktor egyetlen szerin proteáz doménből áll (71). A D-faktort sokáig csak proteolitikusan processzált állapotban tudták kimutatni a vérből (72) ezért feltételezték, hogy hasítása már a szekréciót megelőzően vagy a szekréció során végbemegy (71), de a hasításért felelős enzimet nem tudták azonosítani. A D-faktor azért keringhet processzált formában, mert esetében az

aktivációs peptid lehasadása nem elegendő az aktív konformáció kialakulásához, rendelkezik egy olyan öngátló hurokkal, amely az enzimet inaktív állapotban tartja. Az aktív állapot eléréséhez elengedhetetlen, hogy az enzim kölcsönhatásba lépjen a szubsztrájával (28). Ráadásul a szubsztráttal való kölcsönhatás is szabályozott: a szabadon keringő B-faktort a D-faktor nem ismeri fel. A B-faktor hasítandó peptidkötése kizárólag a C3bB vagy a tick-over mechanizmussal keletkező C3(H₂O)B prokonvertáz komplexben válik hozzáférhetővé a D-faktor számára. Ez a szabályozás biztosítja, hogy csak a „tick-over” mechanizmus révén, illetve a komplement aktiváció helyszínén járuljon hozzá a D-faktor új C3 konvertázok létrejöttéhez.

Az elmúlt években sikerült a D-faktor kis mennyiségben jelenlévő zimogén formáját is kimutatni a vérből, és egyes kutatócsoportok úgy találták, hogy a MASP-1 és/vagy a MASP-3 lehet a D-faktor aktiválásáért felelős enzim. Más kutatócsoportok ugyanakkor úgy találták, hogy sem a MASP-1, sem a MASP-3 nem esszenciális a D-faktor aktiválásához. Ezeket az ellentmondásokra vezető eredményeket részletesebben a 2.2 fejezetben tárgyalom.

1.3.4. A komplementrendszer effektor funkciói

A komplementrendszer aktiválódásának utolsó lépéseként a megtámadott sejt membránjában kialakulhat a MAC, ami a sejt pusztulásához vezethet. A MAC általi lízisre kifejezetten érzékenyek bizonyos mikrobák, például a *Neisseria* fajok (73), ugyanakkor a patogén mikroorganizmusok jelentős része ellenáll a komplement általi lízisnek. A Gram⁺ baktériumok vastag sejtfaluknak köszönhetően MAC-rezisztensek, míg sok más kórokozó fejez ki vagy köt meg a felszínén a MAC kialakulását gátló regulátor fehérjét (74, 75). A MAC kialakulása tehát nem tekinthető a komplementrendszer legfontosabb végrehajtó funkciójának. Két egyéb effektor funkció azonban meghatározó szereppel bír.

Ezek közül az egyik a C3 és C5 hasítása során keletkező C3a és C5a anafilatoxinokon alapul. Ezek a molekulák a komplement aktiváció helyszínére toborozzák és aktiválják a C3aR és C5aR receptorokkal rendelkező leukocitákat. Ezzel az anafilatoxinok hozzájárulnak a helyi, szabályozott gyulladásos környezetet kialakító anyagok aktivált leukocitákból való felszabadulásához és a komplement által felismert és megjelölt részecskék hatékony fagocitózisához.

A komplementrendszer másik meghatározó effektor funkciója az opszonizáció, vagyis a felismert és megtámadott struktúra megjelölése az immunrendszer sejtjei számára. A komplement komponensekkel borított sejteket a megfelelő receptorokkal rendelkező leukociták felismerik és bekebelezik. Ennek fontos szerepe van a patogén mikroorganizmusok és az apoptotikus sejtek

eltávolításában. A legfontosabb komplement eredetű opszonin a C3b és az abból proteolízissel keletkező iC3b, amelyek legjelentősebb receptorai a CR1, CR3 és a CR4. Bizonyos további degradációs termékek (pl. C3dg) is rendelkeznek opszonin hatással (76). Opszoninként szolgálnak még a felszínre lerakódott mintázattfelismerő molekulák, a C1q, az MBL és a fikolinok (77–80), valamint a C4b is.

A komplement aktiváció a veleszületett és az adaptív immunválasz között is hidat képez. A C3 fehérje elengedhetetlen a megfelelő B-sejtes immunválasz kialakulásához (81, 82). A C3 fragmentumokkal opszonizált antigén akkor is hatékonyan aktiválja az antigénre specifikus felszíni immunglobulin receptorral (mIg) rendelkező B-sejteket az mIg és a CR2 receptor keresztkötése révén, ha az mIg:antigén kölcsönhatás affinitása kicsi (83, 84). Az antigénprezentáló sejtek felszínére is lerakódnak C3 fragmentumok, aminek fontos szerepe van a különböző immunsejtek kölcsönhatásaiban, növeli az antigénbemutatás és az antigénspecifikus T-sejt aktiválás hatékonyságát (85, 86), vagyis a komplementrendszer hozzájárul a megfelelő T-sejtes válasz kialakulásához is.

1.3.5. A komplementrendszer szabályozása

A komplementrendszer fontos szereppel bír az immunhomeosztázis fenntartásában, viszont nem megfelelő működése esetén egészséges saját sejteket és szöveteket is károsíthat, súlyos betegségeket és akár életveszélyes állapotot idézhet elő. A komplement aktivitás megfelelő mederben tartására sokrétű és sok esetben redundáns mechanizmusok alakultak ki (3. Ábra) (87). Ezek biztosítják a komplement aktiváció lokális voltának megőrzését és szabnak gátat a komplement válasz túlzott felerősödésének.

A komplement válasz beindításáért és felerősítéséért egyaránt szerin proteázok felelnek. A komplementrendszer saját szervezet általi szabályozása ennek megfelelően részben, de nem kizárólagosan szerin proteáz gátlószereken alapul. A komplementrendszer szabályozásában fontos szerepet bírnak az irreverzibilis mechanizmusú szerpin típusú gátlószerek, mint a C1-inhibitor (C1-inh), amely gátolja a C1r, C1s, MASP-1 és MASP-2 enzimeket, és az antitrombin (AT), amely a MASP-1 és a MASP-2 gátlására képes (88, 89). A többi komplement proteáz esetében nem ismert olyan saját inhibitor fehérje, ami igazoltan fiziológiás jelentőséggel bír. További érdekesség, hogy nem ismert olyan saját, reverzibilis, kanonikus szerin proteáz inhibitor sem, amely a komplementrendszer aktivitását szabályozza. A gyulladások keltő anafilatoxinok aktivitását

a karboxipeptidáz N (CPN) enzim szabályozza, ami a C-terminális arginin csoport lehasításával inaktíválja ezeket a peptideket.

A komplement válasz lokális jellegének megőrzésében fontos szerepe van az aktivált komplement komponensek és az ezekből létrejövő konvertáz komplexek rövid féléletidejének. A tioészter csoportot tartalmazó C4b és C3b fragmentumok féléletideje kb. 100 μ s. Ha a rendelkezésre álló rövid idő alatt nem kapcsolódnak a felszínhez, akkor vízzel reagálnak, és már nem lesznek képesek az aktiváció helyszínétől távolabb kovalensen rögzülni.

Az amúgy is instabil konvertázok néhány perces életidejét különböző szabályozó fehérjék tovább csökkentik, vagy a komplex disszociációjának elősegítésén, vagy proteolitikus hasításon keresztül. A CR1 (CD35), a membrán kofaktor fehérje (CD46) és a lebomlást gyorsító faktor (CD55) membránfehérjék, amelyek a konvertáz egyik komponenséhez kötődve a komplex disszociációját eredményezik. A konvertázok proteolitikus inaktíválásáért az I-faktor nevű szerin proteáz felel, amely hasítja a lerakódott C4b és C3b fragmentumokat. Az I-faktornak kofaktorra van szüksége a működéséhez. Kofaktor lehet a CR1 és a CD46, de fontos kofaktor a H-faktor és a C4b-kötő fehérje is. Utóbbiak szérumban vannak, amik a saját sejtek felszínéhez kötnek, és allosztérikus aktivátorként biztosítják a megfelelő I-faktor aktivitást. A H-faktor az alternatív út legfontosabb szabályozója, míg a C4b-kötő fehérje a klasszikus és lektin útvonalakon kialakuló C4b2a konvertáz komplexek inaktíválását segíti elő (3. Ábra).

Olyan fehérjék is ismertek, amelyek a MAC kialakulását gátolják. A vitronektin és klusztarin megakadályozzák a C5b-7 komplex membránba épülését, míg a CD59 membránfehérje gátolja, hogy a membránba süllyedt C5b-8 komplex C9 fehérjéket kössön, és ezáltal kialakuljon a membránkárosító komplex.

Az így kirajzolódó kép nagy vonalakban a következő. A saját sejtek felszíne eleve nem kedvez a komplement komponensek lerakódásának és ráadásul komplement aktivitást gátló fehérjékben is gazdag. Ennek következtében a saját sejteket nem károsítja a komplementrendszer. Ezzel szemben a legtöbb kórokozó felszínére a komplement komponensek hatékonyan lerakódnak, ami a szabályozó fehérjék hiánya és a properdin komplement aktiválódást segítő hatása miatt a komplement válasz felerősödését és a kórokozó megjelölését eredményezi.

1.3.6. A komplementrendszer és egyes betegségek kapcsolata, az útvonalszelektív inhibitorok jelentősége

A komplementrendszer egyes komponenseinek hiánya vagy nem megfelelő működése a patogének ellen biztosított első védelmi vonal gyengülésével járhat, ami védtelenebbé tesz bizonyos fertőzésekkel szemben. Ilyen komponensek a C1r, C1s, MBL és a MASP-2 (90). A properdin és a MAC komponenseinek hiánya fogékonnyá tesz *Neisseria sp.* általi fertőzésekre (73, 91) összhangban azzal, hogy a *Neisseria* fajok érzékenyek a MAC általi lízisre.

A klasszikus út komponenseinek (C1q, C4, C1r/C1s) hiánya miatt immunkomplexek és apoptotikus sejtek halmozódnak fel. Ez számos vesebetegség mellett egy krónikus autoimmun betegség, a szisztémás lupus erythematosus kialakulásához is vezet, ami sok szervet érintő gyulladásal és szövetkárosodással jár (92).

A komplementrendszer szabályozatlan aktivitása okozza a paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuriát (PNH). A lebomlást gyorsító faktor (CD55) és a CD59 szabályozó fehérjék glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgonnyal rögzülnek a sejtmembrán külső oldalán, viszont a betegek egyes hematopoietikus őssejtjei szomatikus mutáció következtében nem képesek GPI előállítására. A mutáns őssejt leszármazott sejtjeinek felszínét a szabályozó fehérjék hiánya miatt megtámadja az alternatív út, ami a lízisükhöz vezet. Erre leginkább a vörösvértestek érzékenyek. A PNH tünetei változatosak, vérszegénységgel, trombózissal és simaizomgyengeséggel jár, és akár életveszélyes is lehet (93).

Az elmúlt évtizedekben számos betegségről és kóros folyamatról bizonyították, hogy kialakulásában vagy súlyosbodásában szerepe van a komplement aktivitásnak is. A komplementrendszer érintettségét igazolták például az iszkémiás-reperfúziós szövetkárosodás (ischemia reperfusion injury, IRI), a reumatoid arthritisz, az időskori makuladegeneráció és az Alzheimer-kór esetében is.

Ezeknek a betegségeknek a gyógyításához vagy hatékonyabb kezeléséhez komplement aktivitást gátló gyógyszerekre lenne szükség (94). Számos ilyen szer fejlesztése van folyamatban (95), viszont mindössze két komplement inhibitor hatású szer kapta meg a klinikai használatához szükséges engedélyeket: az eculizumab (Soliris®), ami egy C5 fehérjéhez kötő, annak hasítását gátló monoklonális ellenanyag, és a C1-inhibitor (többféle készítmény formájában). A hatóanyagjelöltek közül a compstatin család az egyik legígéretesebb. Ezek a molekulák megakadályozzák a C3 konvertáz és a C3 kölcsönhatását meggátolva a komplement válasz

felelősödését (96). Az említett anyagok közül az eculizumab és a compstatin származékok a központi komplement kaszkádot gátolják, ezért alkalmazásuk megnöveli bizonyos fertőzések kialakulásának kockázatát. A C1-inhibitor a klasszikus és a lektin útvonal mellett gátolja még a gyulladásos folyamatokért felelős kontaktrendszer is. Ugyanakkor a C1-inhibitor terápiás alkalmazása kizárólag a kontaktrendszer nem megfelelő szabályozása miatt kialakuló örökletes angioödéma kezelésére engedélyezett, a komplementrendszer aktivitásával összefüggő betegségek kezelésére nem. Ezek a szerek tehát nem útvonalspecifikus komplement inhibitorok.

Számos komplement aktivitással összefüggő betegség esetében mutatták ki, hogy valamelyik aktivációs útvonal hozzájárulása meghatározó. Elsősorban a klasszikus út érintett az Alzheimer-kórban (97) és a myasthenia gravisban (98), a lektin út aktivitása hozzájárul az IRI kialakulásához különböző szervekben és szövetekben (99–102), míg az alternatív útnak jelentős szerepe van az időskori makuladegenerációban (age-related macular degeneration, AMD) (103) és az atipikus hemolitikus urémiás szindrómában (aHUS) (104). A fentiek tükrében világos, hogy az egyes útvonalakra specifikus inhibitorok hasznos eszközök lehetnek az alaputatásban, a három útvonal fiziológiás és patológiás szerepének feltérképezésében. Emellett útvonalszelektív inhibitorok gyógyszerként is hasznosíthatók lehetnek. Nagy előnyük lenne az általános inhibitorokhoz képest, hogy miközben célzottan blokkolják a betegségben érintett útvonalat, a másik két útvonal és a központi komplement kaszkád zavartalanul betölthetné védelmi funkcióját.

Az egyes aktivációs útvonalakat iniciáló szerin proteázok kézenfekvő célpontjai az útvonalszelektív inhibitorok kifejlesztésének. Ugyanakkor ezek az enzimek mind tripszinszerű szubsztrátspecifitással jellemezhető S1 szerin proteázok, amik egymásra és a vérben működő többi proteolitikus kaszkád enzimre is hasonlítanak. Emiatt valóban specifikus inhibitorok kifejlesztése komoly kihívást jelent. Az enzimek aktívhelyére kötő kismolekulákkal ritkán sikerül megfelelő szelektivitást és affinitást elérni. Pozitív példa a közelmúltból, hogy fragmensalapú gyógyszerfejlesztést (105) alkalmazva specifikus kismolekulás D-faktor inhibitorokat állítottak elő (106). Ugyanakkor ezek a molekulák abban az egyedi, öngátolt konformációs állapotában kötnek a D-faktorhoz, ami ezt a fehérjét a többi enzimtől könnyebben megkülönböztethetővé teszi.

Az ellenanyagok és a kanonikus szerin proteáz inhibitorok nagy kölcsönható felszíneken keresztül kötnek a célenzimhez, ezért ezek fejlesztésével nagyobb eséllyel lehet a kívánt specifitást és affinitást elérni. Jelenleg is preklinikai és klinikai tesztelés alatt állnak egyes komplement szerin proteázokat szelektíven kötő monoklonális ellenanyagok, mint a MASP-3

enzimre specifikus OMS906 (Omeros, az alternatív út aktivitásával kapcsolatos betegségek kezelésére), a C1s enzimre specifikus BIVV020 (Bioverativ, hideg agglutinin betegség kezelésére), a C2 enzimre specifikus PRO-02 (Broteio, IRI kezelésére), a D-faktorra specifikus lampalizumab (Genentech, AMD kezelésére) és a MASP-2 enzimre specifikus OMS721 (Omeros, aHUS, IgA-nefropátia, lupusz nefritisz, C3 glomerulonefritisz és más betegségek kezelésére) (95).

Van példa gyógyszerként használt kanonikus inhibitorra is: az ecallantide (Kalbitor®) egy fágbemutatással fejlesztett inhibitor, ami a plazma kallikrein gátlásán keresztül enyhíti az örökletes angioödémás betegek akut rohamainak lefolyását (107, 108).

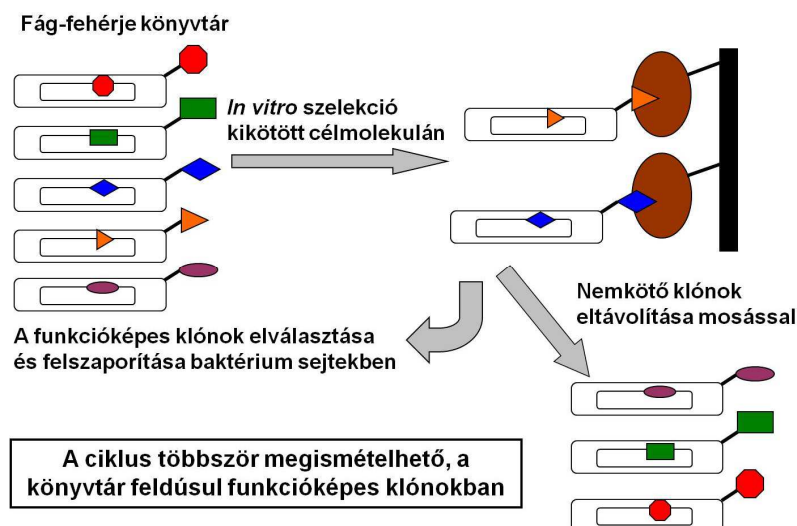
1.4. Az irányított evolúciós megközelítés és a fágbemutatás

A fehérjék klasszikus fehérjemérnöki vizsgálata egy vagy több pozícióban mutáns fehérjék, illetve fehérje fragmentumok előállításán és jellemzésén alapul. Az eredmények alapján felmerülő újabb kérdéseket megválaszolni, a hipotéziseket alátámasztani gyakran csak újabb mutánsok vagy fragmentumok bevonásával van mód, ami ezeket a vizsgálatokat időigényessé és költségessé teszi. Ennek a problémának a leküzdésében jelentett áttörést az irányított evolúciós megközelítésen alapuló módszerek megjelenése.

Az irányított evolúció során a természetes evolúcióhoz hasonló folyamatok játszódnak le. Ezekben a módszerekben közös, hogy működésük a vizsgált fehérje nagyszámú mutánsának előállításán és az így létrehozott sokaságból való szelekción alapul. A kiválasztódás feltétele leggyakrabban egy bizonyos partnerhez való kötés, de lehet akár egy enzimreakció katalízisére való képesség is. A kutató dönti el, hogy a fehérje mely részein mekkora változatosságot hoz létre, és hogy milyen tulajdonságra és hogyan szelektál. Innen az irányított jelző.

A fágbemutatás az irányított evolúciós módszerek legkorábban kifejlesztett képviselője. Egyszerűségének, rugalmasságának és hatékonyságának köszönhetően mindmáig a fágbemutatás a legelterjedtebb irányított evolúciós eljárás. Az eljárás és az alkalmazásával elért eredmények jelentőségének elismeréseképpen a fágbemutatás úttörői, George P. Smith és Sir Gregory P. Winter 2018-ban kémiai Nobel-díjat kaptak, csakúgy, mint Frances H. Arnold, aki egy más jellegű, irányított enzimevolúciós rendszert dolgozott ki.

A fágbemutatók során a vizsgált fehérje génjét egy, legtöbbször fonalas bakteriofág (109) valamely burokkfehérje génjéhez kapcsoljuk. Az így létrehozott fúziós génről termelődő fúziós fehérje beépül a fág-részecske burkába, a vizsgált fehérje pedig megjelenik a bakteriofág felszínén (8. Ábra). A bakteriofág a genomjában hordozza a fúziós gént, ezáltal a fehérje tulajdonságaiban megtestesülő fenotípus és az azt meghatározó genotípus között fizikai kapcsolat létesül (110, 111).



8. Ábra - A fágbemutatók sémája

A vizsgált fehérje génjét a bakteriofág egyik burokkfehérje génjéhez kapcsoljuk, majd kombinatorikus mutagenézissel létrehozunk a fehérje nagyszámú variánsát kódoló DNS könyvtárat. A könyvtárat sejtekbe juttatva a fehérje variánsok klonálisan megjelennek a fág-részecskék felszínén. A fehérje-fág könyvtár tagjai közül kiválasztjuk a célfehérjéhez kötő változatokat és eltávolítjuk a rendszerből a nem-kötő variánsokat. A kiválogatott klónok *E. coli* sejtekben szaporíthatók, ezáltal a ciklus rövid idő alatt többször megismételhető. A folyamat végére a szelektált könyvtár nagy arányban tartalmaz célfehérjekötő klónokat.

A könyvtár elkészítése során a vizsgálatba vont aminosav pozíciókhoz tartozó kodonokat kombinatorikus mutagenézissel változtatjuk meg. Ezáltal megszabjuk a mutációk helyét és a pozíciónkénti variabilitást (112). Az akár több milliárd variánst tartalmazó DNS könyvtárat baktérium sejtekbe juttatva jön létre a fág-fehérje könyvtár. Minden fág-részecske csak egyféle variánst mutat be, és csak ennek a génjét hordozza. A bemutatott variáns által biztosított funkció, például partner fehérjéhez való kötődés alapján a könyvtárból kiválasztjuk az adott funkciót legjobban ellátó variánsokat. A kiválasztott variánsok képesek baktériumokban szaporodni, ami lehetővé teszi, hogy rövid idő alatt több szelekciós kört hajtsunk végre. A variációképzés, a szelekció és az alkalmasabb változatok elszaporítása révén a könyvtár feldúsul funkcionális klónokban (8. Ábra). A fehérjevariánsok és az azokat kódoló gének közti fizikai kapcsolatnak

köszönhetően a kiválasztott fehérjék aminosav sorrendjét DNS szekvenáláson keresztül határozzuk meg. Kellően nagyszámú egyedi klón szekvenálásával kideríthető, hogy milyen mértékű a hozzájárulása a szelekció alapjául szolgáló funkció ellátásához az egyes pozícióknak, illetve az ott szelektálódott aminosav csoportoknak.

A fágbemutató kiválóan alkalmazható nagy interakciós felszíneken keresztül létrejövő fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, valamint újfajta tulajdonságokkal bíró fehérjeváltozatok kifejlesztésére (113, 114). A módszer sikeresen alkalmazható szerin proteázok és inhibitoraik kölcsönhatásainak jobb megértésére és újfajta inhibitorok kifejlesztésére is (23, 37, 38, 115, 116).

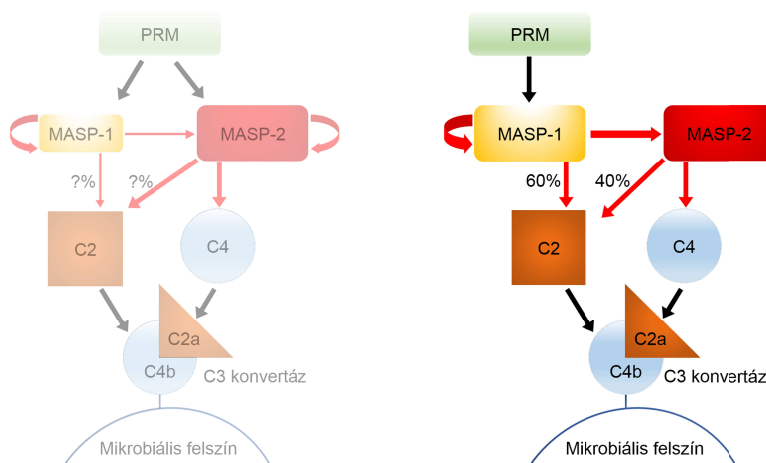
2. A munka közvetlen előzményei és motivációja

2.1. A harmadik generációs MASP-2 inhibitorok kifejlesztésének előzményei és motivációja

2.1.1. A lektin út aktivációs modelljének korrekciója irányított evolúcióval fejlesztett szelektív MASP inhibitorok felhasználásával

Kutatócsoportjaink együttműködésre lépésekor a lektin út aktivációs mechanizmusáról a következő modell volt elfogadott: a MASP-2 a folyamat kulcsenzime, míg a MASP-1 kiegészítő szereppel bír (6. Ábra). Kocsis Andrea doktori munkája során a napraforgóból izolált, a Bowman-Birk inhibitor családba tartozó SFTI (sunflower trypsin inhibitor) molekulát evolválta MASP-1 és MASP-2 kötésre. Mindkét enzimmel szemben sikerült inhibítort kifejlesztenie, de míg a MASP-2 gátlására fejlesztett SFMI-2 (SFTI-based MASP-2 inhibitor) szelektívnek bizonyult, a MASP-1 gátlásra fejlesztett SFMI-1 mindkét enzimet gátolta, igaz a MASP-2 enzimet jelentősen kisebb affinitással. Az SFMI-1 és az SFMI-2 is gátolta a lektin utat különböző tesztekben, miközben nem voltak hatással a klasszikus és az alternatív útra, amivel ezek a molekulák lettek az első szelektív lektin út inhibitorok. A munka legérdekesebb eredménye az volt, hogy a MASP-2 enzimet csak kis affinitással gátló SFMI-1 hatékonyabb lektin út inhibitornak bizonyult, mint a jobb MASP-2 gátló SFMI-2. Ez arra utalt, hogy a MASP-1 enzimnek mégis jelentős szerepe van a lektin út aktivációjában. MASP-1 specifikus inhibitor nélkül azonban nem lehetett a MASP-1 hozzájárulásának mértékét meghatározni (37).

A munkát Héja Dávid folytatta, aki nagyobb affinitással rendelkező monospecifikus MASP-1 és MASP-2 inhibitorok előállítását tűzte ki célul. Ennek érdekében a Pacifastin családba tartozó SGPI-2 (*Schistocerca gregaria* protease inhibitor 2) inhibitorot evolválta. A második generációs MASP inhibitorok, az SGMI (SGPI-2-based MASP inhibitor) molekulák megfeleltek a kitűzött céloknak: sikerült nagy affinitású monospecifikus inhibitorokat előállítani mindkét enzimmel szemben (23). Az SGMI-1 és SGMI-2 inhibitorokkal sikerült igazolni, hogy normál emberi szérumban kizárólag a MASP-1 aktiválja a MASP-2 enzimet, valamint meghatározni azt, hogy a MASP-1 állítja elő a lektin út aktiválódása során keletkező aktivált C2 molekulák 60%-át (56). Ezek az eredmények alapjaiban változtatták meg a lektin út aktivációs mechanizmusáról alkotott képet. Az új modell szerint (9. Ábra) mindkét enzim elengedhetetlen a lektin út beindításához. A MASP-1 autoaktiválódik és aktiválja a MASP-2-t. A MASP-2 C4 komponenst hasít. A felszínre lerakódott C4b fragmentumok C2 fehérjét kötnek, aminek hasításából a MASP-1 és a MASP-2 hasonló mértékben veszi ki a részét. A MASP-1 központi szerepét a lektin út beindításában dän kutatók eredményei is alátámasztották (117). Ez a felismerés mindkét enzimet ígéretes gyógyszercélponttá tette a lektin út aktivitásával összefüggő betegségek kezelésében.



9. Ábra - A lektin út aktivációjának korrigált modellje

A lektin út aktivációs mechanizmusának korrigált modellje szerint a MASP-1 nem támogató szerepet játszik az aktiváció folyamatában, hanem a MASP-2 enzimhez hasonlóan kulcsenzime annak. Ez egyben azt is jelenti, hogy akár a MASP-1, akár a MASP-2 hatékony gátlásával megakadályozható a lektin út aktiválódása.

2.1.2. A MASP-1 és MASP-2 mint gyógyszercélpont molekulák

Az iszkémiás-reperfúziós szövetkárosodás (IRI) egy gyulladásos folyamat, amely egyes szövetek vérrellátásának átmeneti megszűnését (iszkémia), majd helyreállítását (reperfúzió)

követően alakul ki. Az érintett területen aktiválódik a komplementrendszer, aminek következtében nem csak a súlyosan károsodott sejtek pusztulnak el, de ép, vagy regenerációra képes sejtek is. IRI alakul ki a fejlett országokban a vezető halálokok között szereplő szívinfarktust és szélütést követően, valamint szervátültetés vagy koszorúérműtét után. A folyamatban jelentős szerepe van a lektin úton keresztül történő komplement aktivációnak.

Egerekben igazolták, hogy a MASP-2 enzimet nem termelő, vagy előzetesen MASP-2 gátló ellenanyaggal kezelt állatok esetében kisebb mértékű a szövetkárosodás mind szívinfarktust követően, mind gasztrointesztinális IRI modellben, mint a kontroll állatok esetében (100, 118). Hasonló eredményekről számoltak be fokális agyi iszkémiára vonatkozóan is (102). A MASP enzimeket a mintázatfelismerő molekulákról leszorító MAp44 fehérje és az MBL mintázatfelismerő molekula ellen fejlesztett ellenanyag egyaránt enyhítette a szívinfarktus következményeit egerekben (119, 120).

Emberre vonatkozóan is ismertek hasonló adatok az irodalomban. Kimutatták, hogy összefüggés van az MBL deficiencia és az iszkémiás szélütés után kialakuló szövetkárosodás kisebb mértéke, illetve a betegség kedvezőbb kimenetele között (121). A fikolin L (fikolin-2) (122) és a MASP-2 (123) plazma koncentrációja lecsökken szívinfarktust követően, jelezve, hogy ezek felhasználásra kerültek, ami szintén a lektin út érintettségére utal. A lektin út szívinfarktust kísérő IRI-ben való érintettségéről nemrég egy összefoglaló munka is megjelent (124).

Az eddig ismertetett eredmények mind a lektin út és különösen a MASP-2 IRI-hez való jelentős hozzájárulására utalnak. A lektin út korrigált aktivációs modellje alapján az útvonal aktivitása akár a MASP-1, akár a MASP-2 gátlásán keresztül megakadályozható.

Az enzimekről megszerzett ismereteink alapján mégis a MASP-2 tűnik magától értetődőbb gyógyszer-célpontnak. A MASP-2 koncentrációja a MASP-1 enzimnél hússzor alacsonyabb, és a C2 és C4 fehérjéken kívül egyelőre nem ismert egyéb releváns szubsztrátja, ami arra utal, hogy ennek az enzimnek a lektin út beindítása ez egyedüli funkciója. Ezzel szemben a MASP-1-nek több szubsztrátja ismert a lektin út, illetve a komplementrendszer komponensein kívül. A MASP-1 a proteáz-aktivált receptor 4 hasításával aktiválja az endotél sejteket (125) és képes bradikinint felszabadítani a nagy molekulatömegű kininogénből (126), valamint hatással van a vérárvadásra is (127). A közelmúltban Gál Péter kutatócsoportjában kimutatták azt is, hogy a MASP-1-nek jelentős szerepe van az alternatív út aktiválódásában lipopoliszachariddal bevont felszínen (128). Mindezek alapján a MASP-1 gátlásnak vélhetően szerteágazóbb hatásai lennének, mint a MASP-2

gátlásnak. Azt, hogy ez inkább előnyös, vagy inkább hátrányos lenne-e, csak célzott gyógyszerfejlesztési projekttel lehetne eldönteni.

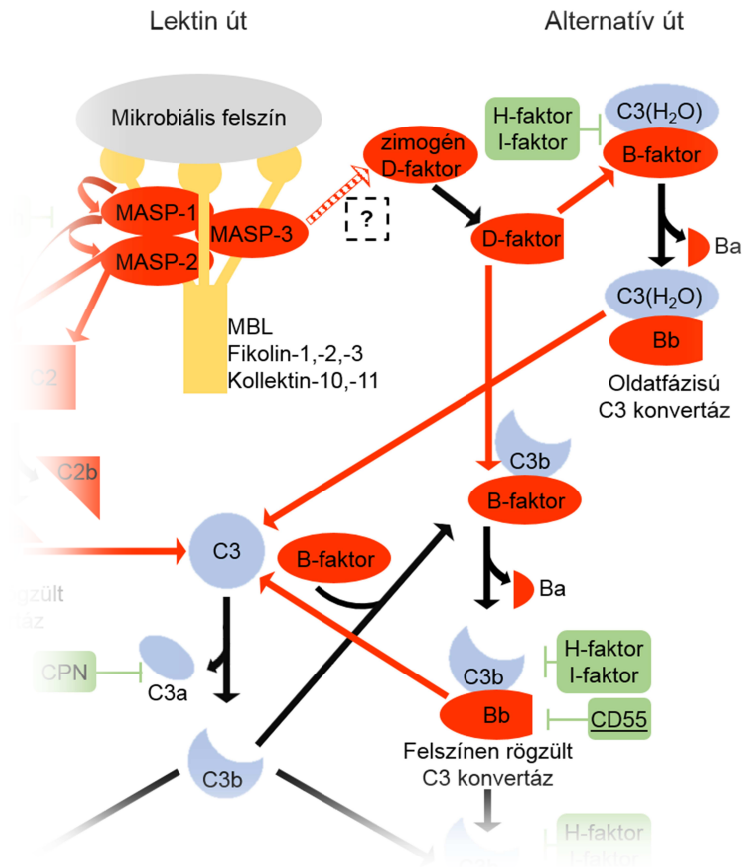
Már a MASP inhibitorok első két generációja is gyógyszerjelöltnek volt tekinthető az *in vitro* kísérletekben és emberi szérummal végzett funkcionális tesztekben mutatott hatásuk alapján. Ugyanakkor ezeket a molekulákat nem emberi, hanem növényi (SFMI), illetve állati (SGMI) eredetű fehérjékből kiindulva fejlesztették ki. Ráadásul ezeknek az inhibitoroknak rokonai sincsenek az emberi szervezetben, ami miatt az SFMI és SGMI molekulák nagy valószínűséggel immunogénnek bizonyultak volna. Ezért fogalmazódott meg bennünk, hogy érdemes egy emberi kanonikus inhibitor fehérjéből kiindulva kifejleszteni a MASP-2 inhibitorok harmadik, az elődöknél nagyobb terápiás potenciállal rendelkező generációját, és előkészíteni az új inhibitorok gyógyszerfejlesztési célú hasznosítását.

2.2. A szelektív MASP-3 inhibitor fejlesztés előzményei és motivációja

A MASP-3 fiziológiás szubsztrátjairól és szerepéről még nagyon keveset lehetett tudni, amikor 2009-ben csatlakoztam az Irányított fehérjeevolúció kutatócsoporthoz. Mint minden hasonló esetben, ennek a kérdésnek a megválaszolásában is hasznos eszköznek ígérkezett egy, az enzimre specifikus inhibitor, aminek létrehozásához laboratóriumunkban megvolt a szükséges tudás és tapasztalat (23, 37, 38, 116). Elsőként Héja Dávid próbált a MASP-3 kötésére inhibitort evolváltni, de nem járt sikerrel. Én örököltém a feladatot, ami doktori munkám egyik fő célkitűzése lett. Mialatt a specifikus MASP-3 inhibitor kifejlesztésén dolgoztam, rendre jelentek meg eredmények, amelyek hol valószínűsítették, hol cáfolták azt, hogy a MASP-1 vagy a MASP-3 lehet felelős a D-faktor aktiválásáért, ami közvetlen kapcsolatot jelentene a lektin út és az alternatív út között (10. Ábra). Ez különösen izgalmassá tette a munkát, mert tudtam, hogy amennyiben sikerrel járok, az inhibitor alkalmazásával bizonyító erejű eredményeket érhetünk el ennek a kérdésnek a tisztázásában.

Teizo Fujita kutatócsoportja írta le, hogy a *MASP-1* génkiütött, sem MASP-1, sem MASP-3 enzimet nem termelő egerek (*MASP-1/3^{-/-}*) szérumában a D-faktor zimogén állapotban van és a mintákban nincs kimutatható alternatív út aktiváció (129). Ebben a tanulmányban a MASP-1 enzimet jelölték meg a D-faktor aktivátoraként, de eredményeikből ez nem következett egyértelműen. Egy következő közleményben a D-faktor aktiválását már a MASP-3-nak tulajdonították. *In vitro* azt kapták, hogy a rekombináns MASP-3 a D-faktort és a B-faktort is

hasítja, sőt, kísérleteikben a D-faktor hasítására a zimogén MASP-3 is képes volt. A vad típusú egerek szérumban hatékony alternatív út működést és B-faktor hasadást mutattak ki, míg a MASP-1/3^{-/-} szérumban ezek a folyamatok nem mentek végbe. MASP-3 hozzáadásával viszont helyre tudták állítani a vizsgált funkciókat (130).



10. Ábra - Irodalmi adatok alapján a MASP-3 alapvető kapcsolatát biztosíthatja a lektin és alternatív útvonalak között

Ezeket az eredményeket egy 3MC szindrómás, MASP-1 és MASP-3 hiányos (MASP-1/3^{-/-}) beteg vérenek vizsgálata alapján dőlt ki, de kutatók kétségbe vonták, mert az alternatív út működőképes volt a mintában. A MASP-3 általi B-faktor hasítást pedig cáfolták, mert MASP-3 enzimet tartalmazó, de D-faktor mentes szérumban nem tapasztaltak alternatív út aktivitást (117). Ezen a ponton azt sem lehetett kizárni, hogy az eredmények közti ellentmondásokat legalább részben az egér és az ember komplementrendszer felépítésének különbségei okozzák.

Később a japán kutatók újabb adatokat közöltek, amelyek árnyalták korábbi következtetéseiket. Az alternatív út legfontosabb regulátorát, a H-faktort nem termelő (H-faktor^{-/-}) egerek és a MASP-1/3^{-/-}H-faktor^{-/-} egerek esetében nem tudtak különbséget kimutatni az alternatív út működésében. A két törzs vérében megegyezett a B-faktor hasítás Ba termékének mennyisége is, ami szintén az alternatív út hasonló működésére utalt. Ugyanakkor a MASP-1/3^{-/-}H-faktor^{-/-} egerek véréből csak zimogén D-faktort tudtak kimutatni. Ebből következtettek arra, hogy nagyon kis mennyiségű aktivált D-faktor keletkezhet MASP-1 és MASP-3 hiányában is, ami a H-faktor hiánya esetén elegendő az alternatív út működéséhez. A D-faktor elenyésző részének aktiválását elvégezhetik más proteázok, például a plazma kallikrein, a plazmin vagy a trombin (131). Újra megvizsgálták, hogy van-e kimutatható alternatív út aktivitás a MASP-1/3^{-/-} egerek szérumban: a MASP-1/3^{-/-} szérum a vadtypusú szérumnál alacsonyabb mértékű nyúl vörösvértest lízist eredményezett (131). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a MASP-1 és/vagy MASP-3 enzim hozzájárul az alternatív út aktivitáshoz, de szerepe nem esszenciális.

A dán és a japán kutatócsoport egymás mintáinak vizsgálatával megállapították, hogy a MASP-1/3^{-/-} egerek vérében tényleg kimutatható alacsony mértékű alternatív út aktivitás (132), illetve hogy a 3MC szindrómás mintákban valóban zimogén állapotban van a D-faktor (133). Az eredményekből kirajzolódik, hogy a MASP-1 és/vagy a MASP-3 szerepet játszik a D-faktor aktiválásában és ezáltal az alternatív út teljesértékű működéséhez szükséges körülmények megteremtésében. Ennek fiziológiai jelentősége ugyanakkor továbbra is kérdéses volt annak tükrében, hogy az alternatív út működése a MASP-1 és MASP-3 hiányában is kimutatható marad.

Gál Péter kutatócsoportjában, Dobó József és Gál Péter irányításával Oroszlán Gábor is foglalkozni kezdett a D-faktor aktivációs mechanizmusának felderítésével és a D-faktort aktiváló enzim azonosításával. A témában 2015 végén jelent meg az első közleményünk (134), amelyhez a kísérletes munka oroszlánrészét Gábor végezte el. *In vitro* kísérletekben mindhárom MASP enzim aktív katalitikus fragmentuma aktiválta a rekombináns zimogén D-faktort, de más proteázok, mint a trombin vagy a tripszin is képesek voltak erre. Viszont a zimogén MASP fehérjék nem aktiválták a D-faktort. A legfontosabb megfigyeléseket a zimogén D-faktor állapotának szérum és citráttal kezelt plazma mintákban való követése eredményezte. Ezekben a kísérletekben Gábor a szérumhoz vagy plazmához fluoreszcensen jelölt zimogén D-faktort adott, majd óránként mintát vett SDS-PAGE analízishez. Az SDS-PAGE géleket lézer szkennelvel olvasta be, majd denzitometriás módszerrel értékelte ki. A zimogén D-faktor szérumban és plazmában is spontán

meghasadt. A kis méretváltozás összhangban volt a mindössze hat aminosavból álló propeptid lehasadásával, ezért a jelenséget a zimogén D-faktor szérumban és plazmában bekövetkező aktiválódásaként értelmeztük. A folyamat felezési ideje szérumban ~3 óra, míg plazmában ~5 óra volt. A plazmában való aktiválódás azt mutatta meg, hogy nyugvó, véralkodásos és gyulladásos folyamatoktól mentes vérben aktív formában van jelen legalább egy, a D-faktor aktiválásáért felelős enzim. A szérumban való gyorsabb aktiválódást eredményezheti az, hogy aktivált véralkodási proteázok (pl. a trombin) is képesek a D-faktor hasítására.

A D-faktor plazmában való aktiválódásának ütemére nem volt hatással a monospecifikus MASP-1 inhibitor SGMI-1. A MASP-2 inhibitor SGMI-2 viszont magas koncentrációban alkalmazva lassította a D-faktor aktiválódását. A hatás mértéke alapján ezt eredményezhette az SGMI-2 általi gyenge MASP-3 gátlás is (56). A MASP-3 D-faktor aktiválásban betöltött szerepére utal az is, hogy a plazmához adott rekombináns MASP-1 és MASP-2 nem gyorsította fel a zimogén hasítását, viszont a rekombináns MASP-3 hozzáadása igen. Az eredmények alapján nem a MASP-1 vagy a MASP-2 felelős a D-faktor aktiválásáért, viszont a MASP-3 szerepe valószínűsíthető a folyamatban.

Specifikus MASP-3 inhibitor hiányában viszont nem tudtuk ezt a feltételezést közvetlen módon igazolni. Ilyen inhibitor birtokában ráadásul nem csak a D-faktor aktiválás folyamatában válna vizsgálhatóvá a MASP-3 szerepe, hanem más folyamatokban is. Ez extra motívációt adott a szelektív MASP-3 inhibitor fejlesztésére.

3. Célkitűzések

Az elmúlt évtizedben igazolták a lektin út és a MASP-2 enzim szerepét az IRI kialakulásában. Mivel az IRI jelentős mértékben hozzájárul a szívinfarktus, szélütés és egyéb iszkémiás kórképek után fennmaradó hosszútávú egészségkárosodáshoz, szelektív lektin út gátló terápiás szerekkel növelni lehetne a betegek túlélési esélyeit, és javítani felépülés utáni életminőségüket. A szelektív lektin út inhibitorok első két generációját témavezetőm, Pál Gábor kutatócsoportja fejlesztette ki fágbemutatással, Gál Péter kutatócsoportjával együttműködésben. Az új inhibitorok alkalmazásával alapkutatási áttörést értek el, amikor feltárták a lektin út valós aktivációs mechanizmusát. Ezeknek a nem-emberi inhibitor vázakon létrehozott molekuláknak azonban az immunogenitás kockázata miatt kérdéses volt a terápiás potenciálja. Témavezetőm kezdeményezésére a két kutatócsoport új, harmadik generációs, emberi fehérjén alapuló lektin út gátlók kifejlesztése irányában folytatta az együttműködést, immár hatóanyagfejlesztési céllal.

Ebben a fejlesztésben kaptam központi szerepet. Doktori munkámban az alábbi célokat igyekeztem elérni:

- A fágbemutatás módszerével feltérképezem az emberi és patkány MASP-2 enzimek aminosav preferencia mintázatát egy emberi vérben jelenlévő inhibitor vázon.
- A kapott mintázatok alapján megtervezem és előállítom a MASP-2 inhibitorok harmadik generációját, törekedve arra, hogy legyen köztük az emberi és a patkány MASP-2 enzimet egyaránt nagy affinitással gátló változat.
- Meghatározom az inhibitorok kötéseirősségét emberi és patkány MASP-2, valamint emberi MASP-1 és MASP-3 enzimekkel szemben.
- Jellemzem az inhibitor variánsok lektin út gátló képességét és útvonalszelektivitását különböző útvonalspecifikus komplement ELISA tesztekben.

Azzal a reménnyel láttam munkához, hogy sikerül létrehozni az emberi MASP-2 minden korábbinál hatékonyabb monospecifikus inhibitorát és az emberi és a patkány MASP-2 enzimet egyaránt nagy affinitással gátló változatokat.

Doktori munkám kezdetén még nem volt ismert a MASP-3 fiziológiás szubsztrátja és az enzim funkciója. Pont ebben az időszakban jelentek meg az első olyan közlemények, amelyek az enzim szerepét valószínűsítették a zimogén D-faktor aktiválásában és felvetették, hogy a lektin és

alternatív útvonalak között létezhethet egy korábban nem ismert kapcsolat. A témában megjelent első közleményünkben kizártuk, hogy az aktív MASP-1 vagy MASP-2, vagy bármely MASP zimogén formája lenne felelős a D-faktor aktiválásáért. A MASP-3 szerepét valószínűsíteni tudtuk a folyamatban, de szelektív MASP-3 inhibitor hiányában ezt közvetlenül nem bizonyíthattuk. A MASP-3 inhibitor fejlesztését ezekkel a munkákkal párhuzamosan végeztem, a következő célkitűzések mentén:

- A fágbemutató módszerével feltérképezem a MASP-3 enzim aminosav preferencia mintázatát egy, a feladatra alkalmas inhibitor vázon.
- A kapott mintázat alapján megtervezem és előállítom a MASP-3 enzim első inhibitorát.
- Meghatározom az inhibitor kötési erősségét az aktív emberi MASP enzimekkel és a zimogén MASP-3 fehérjével szemben.
- Jellemzem az inhibitor specifitását komplement ELISA, véralvadási és plazma pull-down kísérletekben.
- Az inhibitor alkalmazásával azonosítom a MASP-3 fiziológiai szerepét és szubsztrátját.

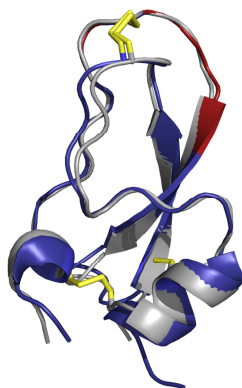
4. Eredmények és tárgyalásuk

4.1. A MASP-2 inhibitorok harmadik generációjának kifejlesztése és jellemzése

4.1.1. A kiindulási inhibitor kiválasztása

A harmadik generációs, csökkent immunogenitás kockázatú MASP-2 inhibitorok létrehozásával kapcsolatban az volt a cél, hogy azt egy emberi vérben fiziológiásan jelenlévő kanonikus inhibitorból fejlesszük ki. Az emberi szervezetben kevés ilyen fehérje van, mert a vérben működő szerin proteázok szabályozása elsősorban serpin típusú inhibitorokon és a nem csak szerin proteázok gátlásra képes, széles specificitású proteáz inhibitoron, az α 2-makroglobulinon alapul.

A TFPI1 (tissue factor pathway inhibitor 1, UniProt ID: P10646) egyike az emberi vérben keringő kanonikus inhibitoroknak. A TFPI1 három Kunitz inhibitor doménnel rendelkezik. A Kunitz domént kb. 60 aminosav alkotja, szerkezetét másodlagos kölcsönhatások mellett három diszulfid híd stabilizálja (11. Ábra). A TFPI1 első két Kunitz doménjének fontos szerepe van a véralvadás kezdeti lépéseinek szabályozásában. Az első Kunitz domén (TFPI1 D1) gátolja a szöveti faktorral komplexben lévő VIIa faktort, míg a második Kunitz domén (TFPI1 D2) a Xa faktor gátlásáért felel (135, 136).



11. Ábra - A Kunitz inhibitor domén szerkezete a TFPI1 D2 és a BPTI példáján bemutatva

A kb. 60 aminosavból álló Kunitz domén két rövid hélixet és két β -szálat tartalmaz, szerkezetét három diszulfid híd (az ábrán sárga színnel megjelenítve) is stabilizálja. Az ábrán a TFPI1 D2 (kék) szerkezetét illesztettem a Kunitz inhibitorok és a kanonikus inhibitorok egyik legtöbbet kutatott képviselője a BPTI (szarvasmarha pankreatikus tripszin inhibitor, szürke) szerkezetére. A szerkezetek az inhibitorok tripszinnel alkotott komplexeinek röntgenkristallográfiás vizsgálatából származnak (PDB: 1TFX, 3TGI).

A TFPI1 fehérjéről kimutatták, hogy gátolja a MASP-2 enzimet, és igazolták, hogy ezért a TFPI1 D2 domén felelős (137, 138). A lektin út aktivitását mérő, nagymértékben hígított szérummal végzett ELISA kísérletben 10 μ M TFPI1 csökkentette felére a lektin út aktivitást, miközben a TFPI1 koncentrációja a plazmában négy nagyságrenddel alacsonyabb, mindössze 2,25 nM (139). Ez alapján a kölcsönhatás fiziológiásan nem releváns, viszont a TFPI1 D2 szerény MASP-2 gátló képessége fontos jelzés volt számunkra az ügyben, hogy a molekula irányított evolúciójával hatékony MASP-2 inhibitorokat kaphatunk. Ezért választottuk a TFPI1 D2 domént kiindulási inhibitor vázként. Korábban a TFPI1 D1 doménből kiindulva fágbemutatással fejlesztették ki az ecallantide (Kalbitor®) nevű kallikrein inhibitor. Az ecallantide az örökletes angioödémás betegeknél a kontakt rendszer szabályozatlan aktivitása miatt kialakuló akut ödémás rohamok kezelésére jóváhagyott gyógyszer (107, 108). Ez mutatja, hogy a TFPI1 módosított Kunitz doménjei alkalmasak lehetnek terápiás felhasználásra.

4.1.2. A TFPI1 D2-fág könyvtár létrehozása és szelekciója

A TFPI1 D2 domént az M13 bakteriofág p8 buroklehéjéhez kapcsoltam és igazoltam, hogy a fehérje működőképes formában jelenik meg a fág felszínén. A könyvtár elkészítése során a P3, P1, P1', P2', P3' és P4' pozíciókban minden aminosav megjelenését megengedtem. A P2 ciszteint megtartottam, mert ez az oldallánc egy, a kanonikus hurok szerkezetét stabilizáló diszulfid hidat alakít ki (F1 Ábra). A DNS könyvtárat *E. coli* sejtekbe elektroporáltam, és 5×10^8 klónt tartalmazó inhibitor-fág könyvtárat kaptam. A könyvtárat immobilizált emberi, illetve patkány MASP-2 katalitikus fragmentumhoz való kötésre szelektáltam. A célnzimhez szelektíven kötő fág klónokat ELISA kísérletekben azonosítottam, majd meghatároztam ezek DNS szekvenciáját. A kiértékelést egyedi szelekciós események alapján kívántam elvégezni, ezért csak olyan klónokkal dolgoztam tovább, amelyek DNS szekvenciája egyedinek bizonyult. Végül a kiértékelést 43 egyedi emberi MASP-2 kötő és 53 egyedi patkány MASP-2 kötő szekvencián végeztem el. A szekvenciákat a Függelékben, az F2 táblázatban mutatom be.

Az irányított evolúció során olyan baktériumtörzset (XL1 Blue Δ eco) használtam, amelyből Boros Eszterrel kiűtöttük az ecotin nevű pán-specifikus szerin proteáz inhibitor fehérje (140, 141) génjét egy homológ rekombináción alapuló módszerrel (142). Erre azért volt szükség, mert a sejtekből kijutó ecotin versenghet a fágon lévő inhibitorral a célpontkötésért mind a szelekció, mind a specifikus célpontkötő klónok azonosítására szolgáló ELISA tesztek során. Az ecotin jelenléte által okozott problémát korábban a fágok megfelelő tisztítási lépéseken keresztül történő

izolálásával tudtuk kiküszöbölni. A XL1 Blue Δ eco törzs létrehozásával és alkalmazásával viszont elértük, hogy a továbbiakban ne merülhessen fel az ecotin jelenléte problémaforrásként.

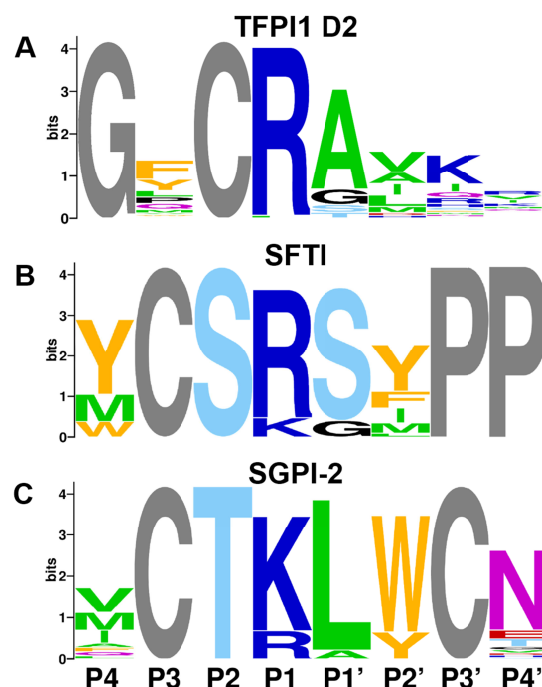
4.1.3. Az emberi MASP-2 preferenciái az evolvált inhibitorok analóg pozícióiban függenek az inhibitor vázszerkezetétől

Az irányított evolúció után azonosított kötőképes klónok szekvenciáinak kiértékelése során az evolvált pozíciókban az egyes aminosavak előfordulási gyakoriságát normáltam az NNK kodonkészletben lévő kodonjaik számával. Az NNK kodonkészletben egyes aminosavakat egyetlen, míg másokat két, vagy akár három kodon kódol, vagyis a könyvtárban nem egyforma az egyes aminosavak kezdeti gyakorisága. A normálás után kapott relatív aminosav gyakoriság értékek azt tükrözik, hogy egyforma kezdeti aminosav gyakoriság esetén milyen változások következtek volna be az irányított evolúció során az egyes pozíciókban.

Az eredményeket szekvencia logók formájában ábrázoltam, amelyek rengeteg információt jelenítenek meg szemléletesen. A logóképzés alapjául szolgáló egyenleteket az 5.3.6 fejezetben mutatom be. Az egyes pozícióknak megfelelő oszlopok magassága attól függ, hogy mennyire szűkült le az adott pozícióban a változatosság. Mind a 20 aminosav teljesen egyenletes eloszlású előfordulása esetén az oszlop magassága nulla, míg egyetlen aminosav kizárólagos előfordulása esetén maximális, jelen esetben bitekben kifejezve $\log_2 20$. Az aminosavakat jelölő betűk magassága az aminosavak relatív gyakoriságával egyenesen arányos. A betűk sorrendje is a gyakoriság függvénye, a leggyakoribb aminosav van legfelül, majd rendre csökkenő gyakoriság szerint követik egymást. A betűk színe az oldallánc kémiai karakterére utal, a hasonló karakterű aminosavak azonos színnel vannak megjelenítve. A könyvtárban nem randomizált pozíciókban szürkével tüntettem fel a vadtypusú aminosavat.

A 12. Ábrán a három különböző, nem-rokon inhibitor vázon kapott emberi MASP-2 kötő klónok szekvencia logóit hasonlítom össze, a TFPI1 D2, az SFTI-alapú (37) és az SGPI-2-alapú (23) logók rendre az A, B és C ábrán láthatók.

A három inhibitor váz eltérő intramolekuláris kölcsönhatásokon keresztül stabilizálja az kanonikus hurok konformációját. Más-más pozíciókban vannak például a diszulfid hidakat kialakító ciszteinek, amiket minden esetben érintetlenül hagytunk. Ezért csak három olyan pozíció van, a P1, P1' és P2', ami mindhárom inhibitor esetében randomizálásra került. Mindhárom összehasonlítható pozícióban jelentős különbségek vannak a három logó között.



12. Ábra - Az emberi MASP-2 által szelektált szekvencia mintázat három nem-rokon kanonikus szerin protáz inhibitor proteázköti hurok régiójában

Az emberi MASP-2 enzim által szelektált kanonikus inhibitor hurok szekvencia mintázatok jelentős eltéréseket mutatnak az (A) TFPI1 D2, (B) SFTI és (C) SGPI-2 inhibitorok esetében. Ez arra utal, hogy a vázszerkezet kihat a MASP-2 és a kanonikus hurok kölcsönhatására, a váz és a hurok nem függetlenek.

Az emberi MASP-2 mindhárom inhibitor vázon csak az S1 preferenciájának megfelelő Lys és/vagy Arg oldalláncokat szelektált a P1 pozícióban, viszont ezek aránya függ a vázszerkezettől. A TFPI1 D2 vázon csak P1 arginint hordozó szekvenciákat kaptam, miközben az SFTI vázon az arginin mellett a lizin is megjelent, az SGPI-2 vázon pedig a lizin volt domináns. A P1' pozícióban az enzim a TFPI1 D2 vázon négy aminosavat (Ala, Gly, Ser, Thr) választott ki, míg az SFTI vázon csak a Ser és a Gly, az SGPI-2 vázon pedig a Leu és az Ala volt alkalmas az enzimkötésre. A P2' pozícióban a TFPI1 D2 vázon négy alifás oldallánc (Val, Ala, Ile, Leu) felelt meg az enzim számára, az SGPI-2 esetében viszont csak az aromás Trp és Tyr. Az SFTI vázon az enzim preferálta az aromás oldalláncokat (Tyr, Phe), de elfogadta az Ile, Met, Leu aminosavakat is.

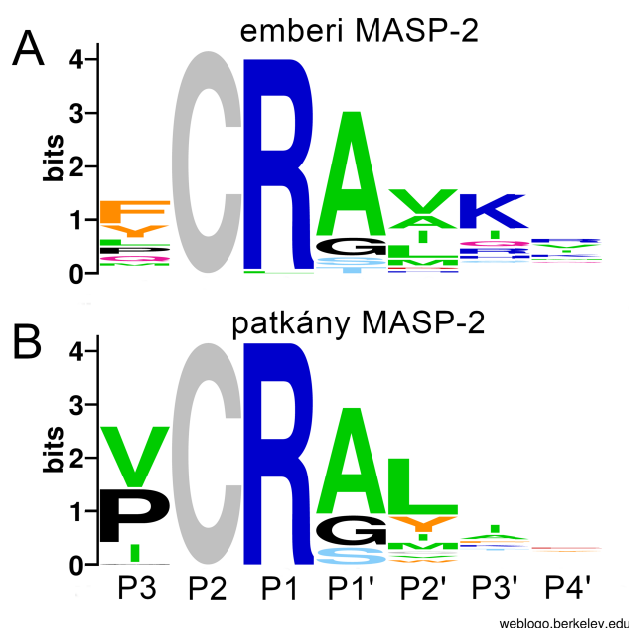
A három mintázat között megfigyelt különbségek mutatják, hogy a különböző inhibitor vázszerkezetek egyedi módon befolyásolják ugyanannak az enzimnek az analóg inhibitor pozíciókban mutatott preferenciáit. Ez arra utal, hogy a kanonikus hurok szekvenciája nem önmagában határozza meg az inhibitor specificitását és affinitását, vagyis a vázszerkezet

befolyásolja a hurok működését. Egy nemrég megjelent közleményben igazoltuk, hogy a kanonikus hurok a vázzal együtt képez egyetlen funkcionális egységet. A huroknak és a váznak együtt (lásd természetes vagy irányított evolúció), vagy legalábbis egymáshoz (lásd irányított evolúció) kell evolválódnia ahhoz, hogy hatékony inhibitor jöjjön létre (38).

4.1.4. A TFPI1 D2 legtöbb evolált pozíciójában az emberi és a patkány MASP-2 aminosav preferenciái hasonlóak

A 13. Ábrán bemutatom az emberi MASP-2 kötő (13A. Ábra) és a patkány MASP-2 kötő (13B. Ábra) klónok szekvenciáiból generált logókat. A kanonikus inhibitorok és célenzimeik kölcsönhatásában az inhibitor részéről általában a P1 és P1' oldalláncok energetikai hozzájárulása a legnagyobb. Ezekben a pozíciókban a két enzim azonos aminosavakat szelektált: a P1 pozícióban arginint, a P1' pozícióban alanint, glicint és szerint. A P2' pozícióban az enzimek hidrofób oldalláncokat válogattak: az emberi MASP-2 esetében túlnyomórészt alifás, a patkány MASP-2 esetében alifás és aromás csoportok vegyesen fordulnak elő. Egyik enzim sem mutatott határozott preferenciákat a P3' és P4' pozíciókban. Az emberi MASP-2 enyhén preferálja a pozitív oldalláncokat, míg a patkány MASP-2 esetében semmilyen elköteleződést nem lehet megfigyelni.

A P3 pozícióban egyértelmű különbség van az enzimek preferenciái között. A patkány MASP-2 kötéshez mindössze négy kis hidrofób oldallánc, a Val, Pro, Ile és Gly bizonyult megfelelőnek. Ezzel szemben az emberi MASP-2 a nagy, aromás Phe és Tyr oldalláncokat preferálta, igaz elfogadta a kis hidrofób Pro, és összesen két klón erejéig a Val aminosavat is. Ebben a pozícióban is van tehát átfedés a két enzim által szelektált aminosavak között.



13. Ábra - Az emberi és a patkány MASP-2 által szelektált szekvencia mintázat a TFPI1 D2 kanonikus hurok régiójában

Az emberi (A) és a patkány (B) MASP-2 enzim aminosav preferenciái hasonlóak a P1-P4' régióban. A P3 pozícióban a két enzim preferenciái között jelentős különbség van, de ebben a pozícióban is van átfedés a szelektált aminosavak között.

4.1.5. Harmadik generációs MASP-2 inhibitorok tervezése a szekvencia logók alapján

A szekvencia logók alapján terveztem meg a MASP-2 inhibitorok harmadik generációjának képviselőit, a TFMI-2 (TFPI1 D2-based MASP-2 inhibitor) molekulákat. A normalizált aminosav gyakoriságok általában korrelálnak az egyes oldalláncok kötési energia hozzájárulásával (38, 116, 143, 144), ezért létrehoztam a P3-P4' régióban az emberi MASP-2 által szelektált konszenzus szekvenciát (FCRAVKR) hordozó variánst, a TFMI-2a inhibitorot. Ez a variáns gátolhatja az emberi MASP-2 enzimet a legnagyobb affinitással. A TFMI-2a a P1-P4' régióban olyan aminosavakat hordoz, amelyek a patkány enzim számára is preferáltak vagy elfogadhatóak lehetnek. Viszont a P3 pozícióban hordozott Phe a patkány enzim gátlása szempontjából valószínűleg kifejezetten előnytelen. Két további inhibitorot állítottam elő, amelyek minden pozícióban mindkét enzim által elfogadható oldalláncot hordoznak. A P3 Phe oldalláncot a patkány MASP-2 által preferált aminosavakkal helyettesítettem: prolinnal a TFMI-2b variánsban (PCRAVKR) és valinnal a TFMI-2c variánsban (VCRAVKR). Ezek az inhibitorok a TFMI-2a helyettesítő molekulái lehetnek a MASP-2 gátlás *in vivo* hatásait patkányokon vizsgáló kutatásokban, ha a TFMI-2a hatástalannak bizonyulna a patkány MASP-2 enzimmel szemben.

4.1.6. A TFMI-2 variánsok hatékony inhibitorai az emberi és patkány MASP-2 enzimnek és nem gátolják az emberi MASP-1 és MASP-3 aktivitását

A TFPI1 D2 inhibitort és a TFMI-2 variánsokat egy laboratóriumunkban kifejlesztett bakteriális expressziós eljárással állítottam elő. Az inhibitorokat tiszta formában izoláltam, majd a fehérjék megfelelő molekulatömegét ESI-MS mérésekkel igazoltuk. A tömegspektrometriás méréseket Kékesi Katalin és Schlosser Gitta végezték el. A fehérjék koncentrációját az enzimgátló képességük alapján határoztam meg ismert koncentrációjú szarvasmarha tripszinnel szemben való titrálással. Az ezáltal lehetővé, hogy az inhibitorok nagy affinitással ($K_I = 4\text{--}94\text{ pM}$) gátolják a szarvasmarha tripszint.

Meghatároztam az inhibitorok K_I értékét emberi és patkány MASP-2, valamint emberi MASP-1 és MASP-3 enzimek katalitikus fragmentumával szemben. Az adatokat az 1. Táblázatban mutatom be. Az összehasonlítást megkönnyítendő a táblázatban feltüntettem az SGMI-2 affinitását is az összes vizsgált enzimmel szemben. Ez utóbbi adatok közül csak a patkány MASP-2 enzimmel szemben mutatott affinitást határoztam meg én.

A TFPI1 D2 a róla leírt gyenge MASP-2 gátló képességgel (138) összhangban valóban gyengén gátolja az emberi MASP-2 enzimet ($K_I = 1883\text{ nM}$) és mérsékelt affinitással ($K_I = 185\text{ nM}$) gátolja a patkány enzimet.

A három TFMI-2 variáns nagy affinitással, alacsony nanomoláris K_I értékkel gátolja az emberi MASP-2 enzimet. Ezek az értékek 50-940-szeres affinitásnövekedést jelentenek a TFPI1 D2 affinitásához képest. A várakozásoknak megfelelően a TFMI-2a affinitása a legnagyobb, K_I értéke 2 nM . Ez háromszor erősebb az SGMI-2, az eddigi leghatékonyabb MASP-2 inhibitor K_I értékénél ($K_I = 6\text{ nM}$) (23). A P3 pozícióban való aminosav helyettesítések hatására a TFMI-2b és TFMI-2c variánsok affinitása a vártnak megfelelően kisebb az emberi enzimmel szemben. A TFMI-2b esetében $7,9\text{ nM}$ (négyeszeres csökkenés), míg a TFMI-2c esetében $36,7\text{ nM}$ (18-szoros affinitás esés). Az inhibitorok szelektivitásával kapcsolatban fontos információ, hogy az emberi MASP-1 és MASP-3 enzimeket egyik TFMI-2 variáns sem gátolja.

Inhibitor	Szekvencia (P4-P4')	K_i (nM)			
		emberi MASP-1cf	emberi MASP-2cf	patkány MASP-2cf	emberi MASP-3cf
TFMI-2a	GFCRAVKR	N.G.	$2,0 \pm 0,1^b$	640 ± 20^b	N.G.
TFMI-2b	GPCRAVKR	N.G.	$7,9 \pm 0,3^b$	$7,2 \pm 0,1^a$	30000^c
TFMI-2c	GVCRAVKR	N.G.	$36,7 \pm 0,7^b$	$7,5 \pm 0,3^b$	N.G.
TFPI1 D2	GICRGYIT	N.G.	1883 ± 48^b	185 ± 4^b	N.G.
SGMI-2	VCTKLWCN	N.G. ^d	6^d	$22,7 \pm 1,6^a$	5200 ± 300^e

1. Táblázat - A TFPI1 D2, a TFMI-2 variánsok és az SGMI-2 emberi MASP-1,-2,-3 és patkány MASP-2 katalitikus fragmentummal szemben meghatározott K_i értékei

^a: Átlag \pm SEM (n = 3)

^b: Átlag \pm range (n = 2)

^c: Becslés egyetlen mérés alapján

^d: Az adat a (23) közleményből származik

^e: Az adat a (56) közleményből származik

N.G.: Nincs kimutatható Gátlás

A patkány MASP-2 enzimet a TFMI-2b ($K_i = 7,2$ nM) és TFMI-2c ($K_i = 7,5$ nM) nagy affinitással gátolja. A két variáns affinitásának hasonlósága az irányított evolúció eredményei alapján is várható volt: a P3 Pro és Val relatív gyakorisága szinte azonos. A P3 pozícióban Phe oldallánccal rendelkező TFMI-2a csak kb. 100-szor kisebb affinitással, 640 nM-os K_i értékkel gátolja az enzimet. Az SGMI-2 affinitása a patkány MASP-2 enzimmel szemben 22,7 nM.

Az eredmények alapján a TFMI-2 variánsokban közös, az emberi MASP-2 által leginkább preferált P1-P4' szegmens (RAVKR) alkalmas a patkány MASP-2 enzimhez való kötésre is. A TFMI-2a által hordozott P3 Phe a várakozásoknak megfelelően kedvez az emberi MASP-2 gátlásának, viszont előnytelen a patkány enzim gátlása szempontjából. A patkány MASP-2 enzimmel szemben mutatott kis affinitása miatt a TFMI-2a nem alkalmas arra, hogy olyan „proof of concept” kísérletben használjuk, amely a MASP-2 gátlás *in vivo* hatásait mutatja ki patkány IRI modellben. Ez a szekvencia logók alapján várható volt, ezért a TFMI-2b és TFMI-2c variánsokat úgy terveztem meg, hogy azok, amely pozíciókban lehetséges, ott mindkét enzim által preferált, ahol pedig ez nem lehetséges, ott mindkét enzim számára elfogadható oldalláncokat hordozzanak. A TFMI-2b közel azonos K_i értékkel gátolja az emberi és a patkány enzimet, ráadásul affinitása az emberi enzimmel szemben mindössze négyszer kisebb a TFMI-2a affinitásánál. Egy hatóanyagjelöltet a modell állatban való inaktivitása miatt helyettesítő molekulának a lehető legjobban kell hasonlítani a hatóanyagjelöltre az előállítás folyamatát, a szennyezőprofil, az

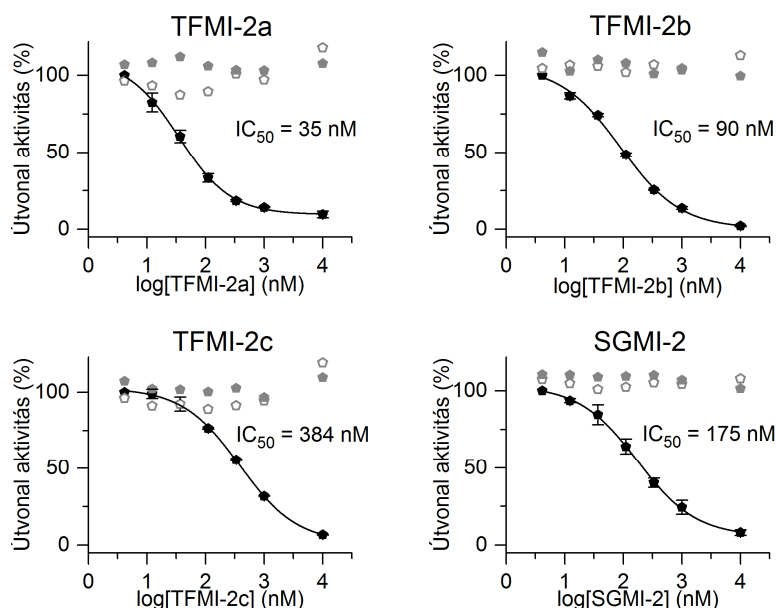
affinitást és a farmakológiai hatásmechanizmust tekintve (145, 146). A TFMI-2b a TFMI-2a variánstól egyetlen pozícióban különbözik, és a két molekula előállítási módja is azonos, vagyis a TFMI-2b megfelelő helyettesítője lehet a TFMI-2a variánsnak patkány kísérletekben.

4.1.7. A TFMI-2 variánsok hatékony és szelektív lektin út inhibitorok normál emberi szérumban

A TFMI-2 variánsok lektin út gátló tulajdonságait többféle szérum ELISA tesztben is jellemeztem azon a kérdéssoron és logikai úton haladva, amit a második generációs inhibitorok kapcsán már alkalmaztunk (56). Minden kísérletben minden inhibitorra meghatároztam a kísérletben kapott maximális jel felére csökkentéséhez szükséges inhibitor koncentrációt (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}). A méréseket elvégeztem SGMI-2 inhibitorral is. A bemutatott eredmények minden esetben egy adott szérum mintával egyszerre elvégzett kísérletekből származnak. Az alkalmazott normál emberi szérum (normal human serum, NHS) minden esetben legalább tíz egészséges önkéntestől származott.

A TFMI-2 variánsok szelektív lektin út inhibitorok a Wieslab teszt szerint

A Wieslab tesztben a három komplement útvonal aktivitását külön-külön lehet mérni hígított szérumban. Az ELISA-alapú teszt végén a keletkezett C5b-9 antigén mennyiségével arányos jelet kapunk. Mindhárom útvonal aktivitását meghatároztam az inhibitorok változó koncentrációi mellett. A TFMI-2 variánsok hatékonyan, koncentrációfüggő módon gátolják a lektin út aktivitását, az IC_{50} értékeik 35 nM és 384 nM között vannak (14. Ábra, 15A. Ábra, 2. Táblázat). Az emberi MASP-2 enzimmel szembeni affinitásokkal összhangban a TFMI-2a a leghatékonyabb és a TFMI-2c a legkevésbé hatékony lektin út inhibitor. Az SGMI-2 IC_{50} értékével (175 nM) összehasonlítva elmondható, hogy a TFMI-2a és TFMI-2b variánsok az SGMI-2-nél hatékonyabb, míg a TFMI-2c kevésbé hatékony inhibitornak bizonyult. Az inhibitorok nem voltak hatással a klasszikus és az alternatív útvonal aktivitására, vagyis a TFMI-2 variánsok szelektív lektin út inhibitorok. Ez egyben azt is jelenti, hogy ezek a variánsok nem gátolják sem a C1r, C1s, D-faktor enzimeket, sem a konvertáz komplexeket.



14. Ábra - A TFMI-2 variánsok és az SGMI-2 hatása a három komplement útvonalra Wieslab tesztben

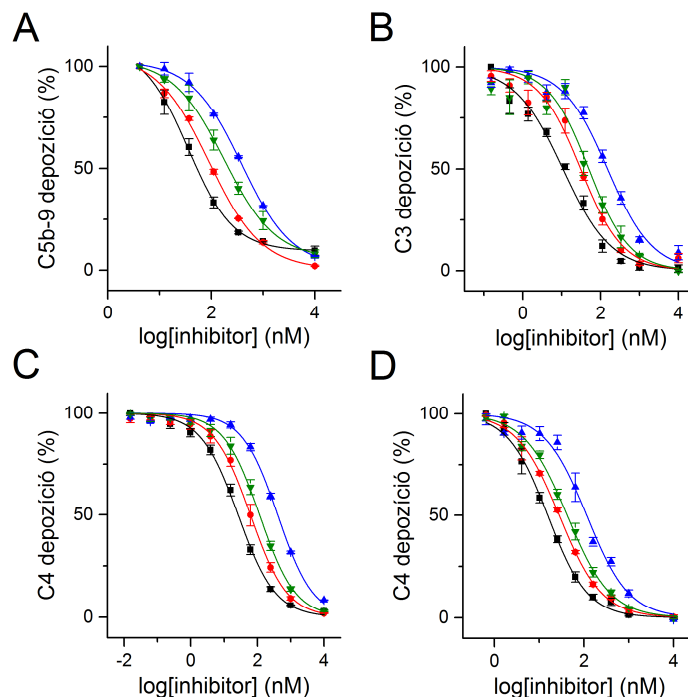
A Wieslab tesztben a lektin utat (fekete ötszögek) hatékonyan, koncentrációfüggő módon gátolja az összes TFMI-2 variáns, míg a klasszikus út (üres szürke ötszögek) és az alternatív út (teli szürke ötszögek) aktivitására egyik inhibitor sincs hatással. Minden szimbólum két mérés átlagát jelöli, a hibaszálók a SEM értéket reprezentálják.

A TFMI-2 variánsok hatékony lektin út gátlók különböző híg szérummal elvégzett komplement ELISA tesztekben

Többféle, a lektin út aktivitásának mérésére beállított ELISA kísérletet végeztem hígított szérummal és a TFMI-2 variánsokkal.

C3 lerakódást mértem mannánnal borított felszínen, amihez 100-szor hígított szérumot használtam. Ebben a kísérletben elsősorban MBL-függő módon aktiválódik a lektin út. A TFMI-2a és TFMI-2b IC_{50} értéke ebben a tesztben 11 nM, illetve 31 nM, alacsonyabb, mint az SGMI-2-é (50 nM). A TFMI-2c IC_{50} értéke 151 nM, elmarad a többi inhibitorétól (15B. Ábra, 2. Táblázat).

Meghatároztam az inhibitorok lektin út gátló hatását C4 lerakódáson keresztül is kétféle, mannánnal (15C. Ábra, 2. Táblázat), illetve acetilált szarvasmarha szérumalbuminnal (AcBSA) (15D. Ábra, 2. Táblázat) borított felszínen is. Az AcBSA-val borított felszínen elsősorban a fikolin L (fikolin-3) felismerő molekulán keresztül aktiválódik a lektin út. Ezek a tesztek a Wieslab teszthez és a C3 lerakódást mérő kísérlethez hasonló eredményre vezettek. Mindkét kísérletben a TFMI-2a volt a legjobb inhibitora a lektin útnak és a TFMI-2b is hatékonyabbnak bizonyult az SGMI-2-nél, míg a TFMI-2c volt a legkevésbé hatékony gátlószer.



15. Ábra - A TFMI-2 variánsok és az SGMI-2 hatása a lektin útra híg emberi szérummal elvégzett komplement ELISA kísérletekben

A TFMI-2a (■), TFMI-2b (●), TFMI-2c (▲) és az SGMI-2 (▼) lektin út aktivációra gyakorolt hatását meghatároztam (A) a Wieslab teszt lektin út specifikus mérésében, (B) 100-szor hígított szérummal mannánnal borított felszínen végzett C3 depozíciós kísérletben, (C) 60-szor hígított szérummal mannánnal borított felszínen végzett C4 depozíciós kísérletben és (D) 60-szor hígított szérummal AcBSA-val borított felszínen végzett C4 depozíciós kísérletben. Az (A) panelen a szimbólumok két mérés átlagát jelölik, a (B), (C) és (D) paneleken a szimbólumok négy mérés átlagát jelölik. A hibaszívek a SEM értéket reprezentálják. A görbékhez tartozó IC_{50} értékeket a 2. Táblázatban tüntettem fel.

Megfigyeltem, hogy a híg szérummal elvégzett lektin út ELISA mérésekben kapott IC_{50} értékek aránya nagyon hasonló mind a négy tesztben (Wieslab teszt, C3 depozíció, C4 depozíció kétféle felszínen). Az összes kísérletben a TFMI-2a volt a leghatékonyabb lektin út inhibitor. A TFMI-2b IC_{50} értékei a TFMI-2a értékeinél 1,7-2,8-szor magasabbak. A TFMI-2b-t az SGMI-2 követi a TFMI-2a-nál 2,6-5,0-szor magasabb IC_{50} értékekkel, végül a TFMI-2c következik a TFMI-2a-nál 7,2-15,6-szor nagyobb IC_{50} értékekkel (15. Ábra, 2. Táblázat).

A híg szérummal végzett komplement ELISA kísérletek egy alapvető kérdésben hasonlítanak egymásra: a szérumot nagymértékben meghígítjuk és inhibitorral előinkubáljuk, mielőtt az aktiváló felszínre mérnénk a mintákat. A kezdetben zimogén MASP enzimek aktiválódása így az inhibitorok jelenlétében kezdődik el, amint a felismerő komplex megkötődik a felszínen. Az eredmények alapján az inhibitorok egymáshoz viszonyított hatékonyságát ilyen kísérletes

elrendezés esetén nem befolyásolja jelentősen az, hogy milyen lektin út aktiváló molekulával van borítva a felszín, illetve, hogy melyik komplementaktiválódási terméket detektálom az előhívás során.

Inhibitor	Wieslab teszt*, 100-szor hígított NHS		C3 depozíció, mannánnal borított felszín, 100-szor hígított NHS		C4 depozíció, mannánnal borított felszín, 60-szor hígított NHS	
	IC ₅₀	Relatív értékek a TFMI-2a-hoz képest	IC ₅₀	Relatív értékek a TFMI-2a-hoz képest	IC ₅₀	Relatív értékek a TFMI-2a-hoz képest
	(nM)		(nM)		(nM)	
TFMI-2a	35	1,0	11	1,0	26	1,0
TFMI-2b	90	2,6	31	2,8	62	2,4
TFMI-2c	384	11,0	151	13,7	406	15,6
SGMI-2	175	5,0	50	4,5	116	4,5

Inhibitor	C4 depozíció, AcBSA-val borított felszín, 60-szor hígított NHS		C4 depozíció, mannánnal borított felszín, előaktivált PRM:MASP komplexekkel		C4 depozíció, mannánnal borított felszín, 1:1 arányban hígított NHS	
	IC ₅₀	Relatív értékek a TFMI-2a-hoz képest	IC ₅₀	Relatív értékek a TFMI-2a-hoz képest	IC ₅₀	Relatív értékek a TFMI-2a-hoz képest
	(nM)		(nM)		(nM)	
TFMI-2a	16	1,0	423	1,0	870	1,0
TFMI-2b	28	1,7	974	2,3	430	0,5
TFMI-2c	115	7,2	1457	3,4	1150	1,3
SGMI-2	42	2,6	3574	8,4	15400	17,7

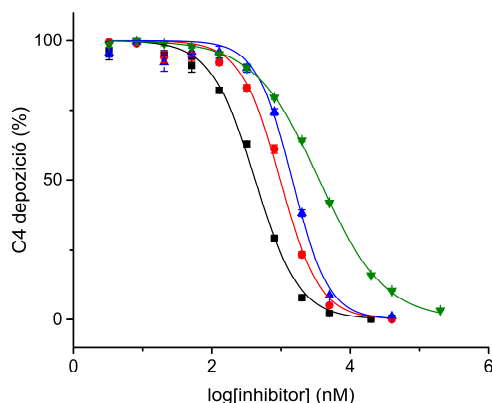
2. Táblázat - A TFMI-2 variánsok és az SGMI-2 IC₅₀ értékei komplement ELISA tesztekben

Az IC₅₀ értékek összehasonlítását segítőként feltüntettem a TFMI-2a értékeihez viszonyított relatív IC₅₀ értékeket is. *A táblázatban a Wieslab teszt lektin út specifikus mérésének eredményei szerepelnek.

A TFMI-2 variánsok gátolják az aktív MASP:PRM komplexek általi C4 depozíciót

Ez a kísérlet egy alapvető kérdésben különbözik az eddig bemutatottaktól. A kísérlet első fázisában a szérumot magas ionerejű pufferrel keverve visszük fel a lemez mannánnal borított mintahelyeire. Ilyen körülmények között PRM komplexek, elsősorban MBL köt a felszínhez, aktiválódnak a felismerő molekulához kötött MASP enzimek, de nem rakódnak le C4 fragmentumok (37, 147, 148). A lemez mosása után aktív MASP enzimeket tartalmazó PRM komplexekkel borított, de C4 fragmentumoktól mentes felszínt kapunk, amire tisztított C4 fehérje inhibitorokkal előinkubált, fiziológiai kémhatású és ionerősségű oldatát visszük fel, és detektáljuk a felszínre rakódott C4 fragmentumokat.

Ez az elrendezés valószínűleg jobban modellezi azt a helyzetet, ami az inhibitorokat az akut IRI helyszínén fogadja, ahol már aktivált enzimek kötéseért kell versengeniük a természetes szubsztrátokkal, így a C4 fehérjével. Ezért lényeges jelentőséggel bírhat, hogy ebben a tesztben a TFMI-2 variánsok mindegyike hatékonyabban gátolta a C4 depozíciót (423-1457 nM közti IC_{50} értékekkel, lásd (16. Ábra, 2. Táblázat)), mint az SGMI-2 (3574 nM IC_{50} érték).



16. Ábra - A TFMI-2 variánsok és az SGMI-2 hatása az előaktivált PRM:MASP komplexek általi C4 depozícióra

A TFMI-2a (■), TFMI-2b (●), TFMI-2c (▲) és az SGMI-2 (▼) egyaránt gátolja a felszínhez kötött, aktivált PRM:MASP komplexek általi C4 depozíciót. Ebben a kísérletben mindhárom TFMI-2 variáns hatékonyabban gátolta a C4 depozíciót, mint az SGMI-2. A szimbólumok négy mérés átlagát jelölik, a hibaszíjak az SEM értéket reprezentálják. A görbékhez tartozó IC_{50} értékeket a 2. Táblázatban tüntettem fel.

Az inhibitorokkal előinkubált híg szérummal végzett kísérletekben kapott IC_{50} értékek arányai a K_i értékek arányait tükrözték, azaz azokban a tesztekben az inhibitorok affinitása határozta meg az inhibitorok hatékonyságát. Ebben a tesztben ezek az arányok megváltoztak: a TFMI-2c hatékonysága közelebb került a TFMI-2a és TFMI-2b inhibitorokéhoz, miközben az SGMI-2 hatékonysága elmaradt a TFMI-2 variánsokétól. Ezt magyarázhatja, ha ebben a tesztben a hatékonyságot elsősorban nem az affinitás, hanem az asszociáció sebessége szabja meg, és a TFMI inhibitorok ebben jobban teljesítenének, mint az SGMI-2. Ennek ellenőrzését a jövőben el fogjuk végezni.

A C4 lerakódás teljes gátlása ebben az elrendezésben csak akkor valósulhat meg, ha az inhibitorok képesek lényegesen gyorsabban kötődni a MASP-2 enzimhez, mint a C4. Ez a tulajdonság nagyon fontos lehet a szívinfarktust és szélütést kísérő akut IRI kezelésére való alkalmasság szempontjából, ezért ezen a ponton érdemes tenni egy rövid kitekintést.

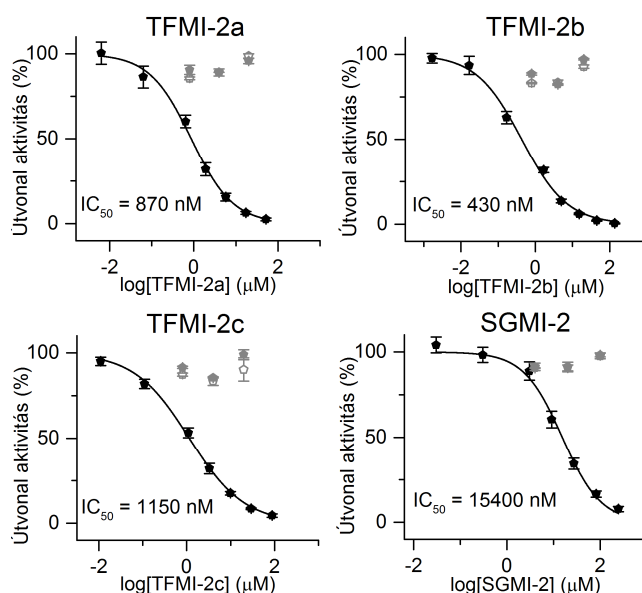
A MASP-2 gátlásnak az IRI következményeit enyhítő hatását demonstráló kísérletekben MASP-2 kötő ellenanyagokat alkalmaztak. A kísérletekben az állatokat órákkal, vagy akár napokkal az IRI kiváltása előtt kezelték az ellenanyaggal (100, 102). Elképzelhető, hogy erre azért volt szükség, mert az ellenanyag nem képes gyorsan PRM:MASP-2:ellenanyag komplexet képezni, ezért az IRI kiváltásával egyidejűleg vagy azt követően beadott ellenanyagnak nincs hatása. Ha a hatás eléréséhez valóban szükség van az előkezelésre, akkor az adott ellenanyagot csak hosszú ideig fenntartott MASP-2 gátlást igénylő krónikus betegségek kezelésére, vagy IRI-t kiváltó időzített műtétek előtt és után, az IRI következményeinek mérséklésére lehetne alkalmazni. Az Omeros által fejlesztett anti-MASP-2 ellenanyaggal (OMS721) második, illetve harmadik fázisú klinikai vizsgálatok zajlanak, amelyekben az ellenanyag alkalmazhatóságát vizsgálják többféle krónikus betegség kezelésében (pl. IgA-nefropátia, lupusz nefritisz, C3 glomerulonefritisz és aHUS). Érdekes módon ezekben a betegségekben eddig az alternatív út érintettségét írták le, és nem tisztázott a MASP-2 gátlás kedvező hatásának háttere (94). Az ellenanyag akut kezelést igénylő klinikai állapotok, mint a szívinfaktus vagy a szélütés kezelésében való alkalmazhatóságának vizsgálatáról nincs elérhető információ. Az IRI által kísért akut betegségek kiegészítő kezelésére a fentiek alapján a TFMI-2 variánsok vagy hasonló kis fehérjék a MASP-2 gátló ellenanyagoknál alkalmasabbak lehetnek.

Tömény szérumban a TFMI-2 variánsok jelentősen hatékonyabb lektin út inhibitorok, mint az SGMI-2

Az inhibitorok további jellemzésére a fiziológiás fehérjekoncentrációkat jobban tükröző, 1:1 arányban hígított szérummal is végeztem útvonalszelektív komplement ELISA kísérleteket (56).

A lektin út szelektív teszthez készített minták 100 µg/mL nátrium polianethol-szulfonátot (sodium polyanethol sulfonate, SPS) tartalmaztak, ami ebben a koncentrációban megakadályozza a klasszikus és az alternatív út aktiválódását (149, 150). Ebben a kísérletben az IC₅₀ értékek alapján a TFMI-2 variánsok 13-36-szor hatékonyabban gátolták a lektin utat, mint az SGMI-2. Érdekes módon ebben a kísérletben nem a TFMI-2a, hanem a TFMI-2b bizonyult a legjobb inhibitornak (17. Ábra, 2. Táblázat). Ez is mutatja, hogy az inhibitorok egymáshoz viszonyított hatékonysága függhet a kísérlet elrendezéstől. Érdekes tehát az inhibitorokat többféle tesztben jellemezni, és az eredmények összessége alapján kiválasztani a legígéretesebb variánst.

A klasszikus és az alternatív út mérésekben az inhibitoroknak olyan koncentráció sorozatát alkalmaztam, ami a lektin út szelektív kísérletekben 10-90% gátlást eredményezett. Az inhibitorok ezekben a kísérletekben hatástalanok voltak. Ez igazolja, hogy a TFMI-2 variánsok közel tömény szérumban is hatékony és szelektív lektin út gátlók (17. ábra).

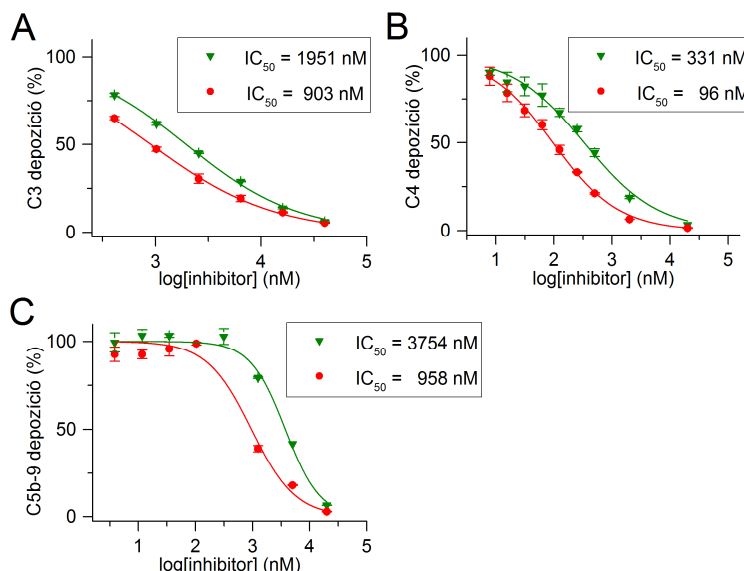


17. Ábra - A TFMI-2 variánsok és az SGMI-2 hatása az egyes komplement aktivációs útvonalakra 1:1 arányban hígított normál emberi szérumban

Az inhibitorok koncentrációfüggő módon gátolják a lektin utat (fekete ötszögek), és nincsenek hatással sem a klasszikus útra (üres szürke ötszögek), sem az alternatív útra (teli szürke ötszögek). A szimbólumok négy mérés átlagát mutatják a lektin út mérések esetében és két párhuzamos átlagát mutatják a klasszikus és az alternatív út mérések esetében. A hibaszímlók a SEM értéket reprezentálják.

4.1.8. A TFMI-2b a leghatékonyabb lektin út inhibitor patkány szérumban

Az affinitásadatok alapján a TFMI-2b ígérkezett a leghatékonyabb lektin út gátlónak patkány modellben. Az állatkísérletek megalapozása érdekében patkány szérumban is meg kellett határozni hogy a TFMI-2b milyen hatékonyan akadályozza meg a C3 és C4 fragmentumok, valamint a C5b-9 komplex lerakódását lektin út specifikus tesztekben. Ezeket a méréseket Kocsis Andrea végezte az MTA TTK Enzimológiai Intézetben, Gál Péter kutatócsoportjában.



18. Ábra - A TFMI-2b és az SGMI-2 lektin út gátló hatása patkány szérummal végzett komplement ELISA kísérletekben

A TFMI-2b (●) és az SGMI-2 (▼) hatása a lektin útra mannánnal burkolt felszínen elvégzett (A) C3 depozíció, (B) C4 depozíció és (C) C5b-9 depozíció ELISA kísérletekben. Minden szimbólum két mérés átlagát jelöli, a hibaszívek a SEM értéket reprezentálják.

A kísérleteket Andrea híg patkány szérumon végezte el, alapvetően a híg emberi szérummal végzett kísérletekkel azonos módon. A TFMI-2b hatását a patkány MASP-2 enzimet szintén gátló SGMI-2 hatásával hasonlítottuk össze. A TFMI-2b mindhárom kísérletben alacsonyabb IC_{50} értékkel gátolta a lektin utat a patkány szérumban, mint az SGMI-2 (18. Ábra, 3. Táblázat). A TFMI-2b IC_{50} értékei 2,2-3,9-szer alacsonyabbak az SGMI-2 értékeinél. Az eredmények alapján a TFMI-2b az eddig létrehozott leghatékonyabb patkány MASP-2 inhibitor, ami patkány szérumban is működik.

Inhibitor	C3 depozíció, mannánnal borított felszín, 70-szer hígított patkány szérum		C4 depozíció, mannánnal borított felszín, 60-szor hígított patkány szérum		C5b-9 depozíció, mannánnal borított felszín, 50-szer hígított patkány szérum	
	IC ₅₀ (nM)	relatív értékek a TFMI-2b-hez képest	IC ₅₀ (nM)	relatív értékek a TFMI-2b-hez képest	IC ₅₀ (nM)	relatív értékek a TFMI-2b-hez képest
TFMI-2b	903	1	96	1	958	1
SGMI-2	1951	2,2	331	3,4	3754	3,9

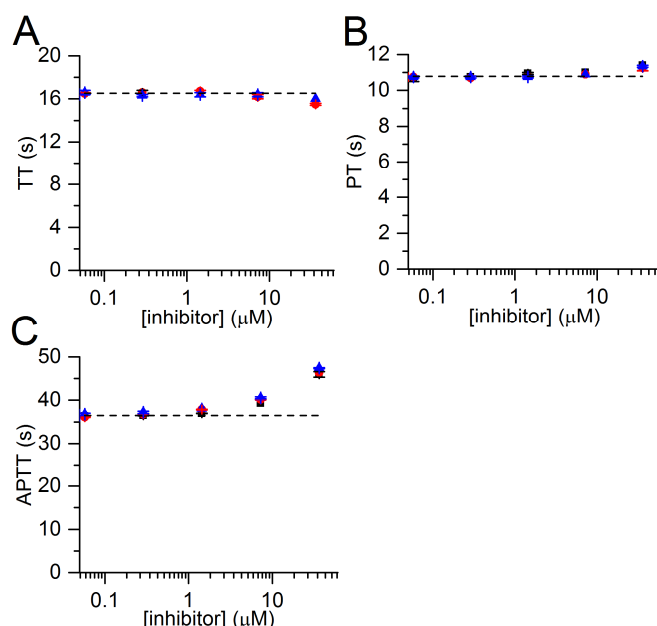
3. Táblázat - A TFMI-2b és az SGMI-2 IC₅₀ értékei patkány szérummal elvégzett komplement ELISA kísérletekben

Az IC₅₀ értékek összehasonlítását segítőként feltüntettem a TFMI-2b értékeihez viszonyított relatív IC₅₀ értékeket is.

4.1.9. A TFMI-2 variánsok nem befolyásolják a véralvadást

A véralvadás a komplementrendszerhez hasonlóan szerin proteázok kaszkádszerű aktivációján alapuló létfontosságú folyamat. A véralvadás TFMI-2 variánsok általi gátlása előnytelen lenne az inhibitorok terápiás potenciálja szempontjából. Ennek ellenőrzésére Pál Gábor és Szász Róbert elvégeztek három, a klinikai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott tesztet az általam előállított inhibitorokkal. A trombin idő (thrombin time, TT) megváltozása a trombinra gyakorolt hatást mutatná ki, a protrombin idő (prothrombin time, PT) megváltozása a véralvadás külső útvonalának befolyásolására utalna, míg az aktivált parciális tromboplastin idő (activated partial thromboplastin time, APTT) megváltozása a véralvadás belső útvonalának befolyásolását jelezné. A TFPI1 gátolja a véralvadást a PT és APTT tesztekben (151), ezért is volt fontos ellenőrizni a TFMI-2 variánsok hatását a véralvadásra.

Az inhibitorok legnagyobb koncentrációja a mérések során 36 μ M volt, ami 3-4 nagyságrenddel magasabb az emberi MASP-2-vel szemben mutatott affinitásuknál. Az inhibitorok ebben a nagyon magas koncentrációban is hatástalannak bizonyultak a TT és PT tesztben, és az APTT értéknek is csak kismértékű növekedését eredményezték (19. ábra). Ez alapján a TFMI-2 variánsok legfeljebb elhanyagolható hatással vannak a véralvadásra.



19. Ábra - A TFMI-2 variánsok véralvadásra gyakorolt hatása három standard alvadási tesztben

A TFMI-2a (■), TFMI-2b (●) és a TFMI-2c (▲) véralvadásra gyakorolt hatása három standard véralvadási tesztben: (A) TT, (B) PT and (C) APTT. Az inhibitorok nincsenek hatással a TT és PT értékekre. Magas koncentrációban alkalmazva a TFMI-2 variánsok kismértékben növelik az APTT értéket. Minden szimbólum két mérés átlagát jelöli, a hibaszalók a SEM értéket reprezentálják. A kontroll értékeket hat inhibitorot nem tartalmazó plazmával végzett mérésből átlagoltam és vízszintes szaggatott vonalként tüntettem fel.

4.1.10. Konklúzió

A szívinfarktus és szélütés után fennmaradó hosszútávú egészségkárosodáshoz nagymértékben hozzájárul az IRI, aminek kialakulásában jelentős szerepe van a lektin útnak. A lektin utat gyorsan és hatékonyan gátló molekulák terápiás alkalmazásával az IRI mértéke csökkenthető, és ezáltal a betegek felépülés utáni életminősége javítható lehet.

A kutatócsoportjaink által korábban kifejlesztett MASP-2 inhibitorok rendkívül hasznosnak bizonyultak az alapkutatásban, de valószínűsíthető immunogenitásuk miatt nem volt egyértelmű ezek terápiás alkalmazhatósága. Ezért témavezetőm elindította olyan MASP-2 inhibitorok fejlesztését, amelyek az emberi keringésben jelenlévő inhibitoron alapulnak, és amelyek egyaránt képesek gátolni az emberi és a patkány MASP-2 enzimet.

Választásunk a TFPI1 D2 doménre esett. Az inhibitor kanonikus hurok régióját evolváltam emberi és patkány MASP-2 kötésre és megállapítottam, hogy a legtöbb evolvált pozícióban hasonlítanak az enzimek preferenciái. Ugyanakkor azonosítottam lényegi eltérést is közöttük, ami előre vetítette, hogy az emberi MASP-2 leghatékonyabb inhibitora (TFMI-2a) a patkány enzimet

kis affinitással lesz képes gátolni. Ezért létrehoztam olyan variánsokat (TFMI-2b és TFMI-2c) is, amelyek képesek lehetnek mindkét enzim hatékony gátlására.

Megállapítottam, hogy a TFMI-2 variánsok nem gátolják a MASP-1 vagy MASP-3 enzimeket, és az emberi és patkány MASP-2 enzimmel szemben meghatározott K_i értékeik összhangban vannak az enzimek aminosav preferencia mintázatával. A TFMI-2a az emberi MASP-2 eddig létrehozott legnagyobb affinitású inhibitora, viszont a patkány enzimet valóban kis affinitással gátolja. A TFMI-2b ugyanakkor hatékonyan gátolja az emberi és a patkány MASP-2 enzimet is.

Komplement ELISA kísérletekben igazoltam, hogy emberi szérumban az összes TFMI-2 variáns hatékony és szelektív lektin út inhibitor. A TFMI-2a és TFMI-2b minden tesztben hatékonyabbnak bizonyult az SGMI-2 molekulánál, a korábban létrehozott legerősebb MASP-2 inhibitornál. Különösen fontos, hogy a TFMI-2 variánsok képesek teljes mértékben meggátolni az előaktivált PRM:MASP komplexek általi C4 depozíciót, vagyis képesek gyorsan, a MASP-2 fiziológiás szubsztrátjával versengve is stabil PRM:MASP-2:TFMI-2 komplexet képezni. Ez feltétele lehet az akut IRI kezelésére való alkalmasságnak, és a rendelkezésre álló információk alapján elképzelhető, hogy a MASP-2 gátló ellenanyagok nem rendelkeznek ezzel a képességgel.

Az állatkísérletek megalapozása érdekében kimutattuk, hogy a TFMI-2b patkány szérumban is gátolja a lektin út aktivitását. Az eredmények összessége alapján a TFMI-2b alkalmas helyettesítője lehet a TFMI-2a variánsnak az inhibitorral való kezelés, illetve a MASP-2 gátlás *in vivo* hatásait patkányokon vizsgáló kutatásokban.

A véralvadás TFMI-2 variánsok általi gátlása súlyos mellékhatásokhoz vezethetne, ezért standard klinikai tesztekben vizsgáltuk, hogy az inhibitorok befolyásolják-e a véralvadást. Az eredményeink alapján az inhibitoroknak nincs jelentős hatásuk a véralvadásra. Ez a többi eredménnyel együtt igazolja, hogy az TFMI-2 variánsok a komplementrendszer és a véralvadási kaszkád szerin proteázai közül kizárólag a MASP-2 enzimet gátolják.

Úgy ítéltük meg, hogy a TFMI-2 variánsok megfelelnek a célkitűzésekben megfogalmazott követelményeknek és ígéretes hatóanyagjelölt molekulák az akut IRI kezelésére. Az eredmények alapján ELTE, illetve az MTA szolgálati találmány jött létre, amelynek tulajdonjogával az EvolVeritas Biotechnológiai Kft. rendelkezik. Az EvolVeritas szabadalmi igényt nyújtott be, és terápiás irányba fejleszti tovább a találmányt.

4.2. MASP-3 inhibitor kifejlesztése, jellemzése és alkalmazása a MASP-3 fiziológiás szerepének felderítésére

Korábban többféle inhibitor váz alkalmazásával is megkíséreltük szelektív MASP-3 inhibitort kifejlesztését, de nem jártunk sikerrel. A következőkben csak a sikerre vezető kísérletsorozat eredményeit mutatom be.

4.2.1. MASP-3 kötő klónok szelekciója a TFPI1 D2-fág könyvtárból

Az 5×10^8 klónt tartalmazó TFPI1 D2-fág könyvtárat az emberi és patkány MASP-2 enzimekhez való kötés mellett emberi MASP-3 rekombináns katalitikus fragmentumhoz való kötésre is szelektáltam. Az irányított evolúciós kísérletsorozatot, a specifikus MASP-3 kötő klónok azonosítását, ezek DNS szekvenciájának meghatározását és az eredmények szekvencia logó formájában való ábrázolását azonos módon végeztem, mint a MASP-2 célenzimek esetében. A specifikus MASP-3 kötő klónokat a harmadik szelekciós ciklus során kapott fágok között azonosítottam. A szekvencia logó létrehozásához 31 egyedi DNS szekvenciát használtam fel. Ezeket a Függelékben, az F3 Táblázatban mutatom be.

4.2.2. A MASP-3 által szelektált inhibitor hurok szekvencia mintázat különösen hidrofób

A MASP-3 kötő klónok szekvenciáiból generált logót a 20. Ábrán mutatom be. A P1 pozícióban a MASP-3 tripszinszerű S1 zsebének megfelelően Lys és Arg fordul csak elő, amelyek közül a Lys gyakoribb. A többi pozícióban a MASP-3 gyakorlatilag csak hidrofób oldalláncokat szelektált, az egyetlen kivétel a P3' pozícióban megjelenő Arg. A MASP-3 szubsztrátkötő árka apoláros természetű (152), a kapott szekvencia mintázat apoláros jellege ezzel összhangban van.

A szekvencia mintázatnak nem csak a hidrofób jellege említésre méltó, hanem az egyes pozíciókban megfigyelt alacsony változatosság is. A kanonikus hurok szélein, a P3' és a P4 pozícióban a lehetséges húsból négy-négy oldalláncot választott ki a MASP-3. A hurok közepén, a P1-P3' régióban ennél is kevesebb, pozíciónként mindössze két-két aminosav bizonyult az enzim számára megfelelőnek. Az egyes pozíciókon belül a szelektált aminosavak mind kémiai karakterüket, mind méretüket tekintve hasonlítanak egymásra. Ez azt mutatja, hogy a MASP-3 szigorú feltételeket támaszt az inhibitor felé, és csak azzal az inhibitorral lép kölcsönhatásba, ami ezeknek mind megfelel.



20. Ábra - A MASP-3 által szelektált TFPI1 D2 variánsok szekvencia logója

A MASP-3 által szelektált TFPI1 D2 klónok DNS szekvenciáját meghatároztam majd az evolált pozíciókban az egyes aminosavak előfordulási gyakoriságát normáltam az NNK kodonkészletben lévő kodonjaik számával. Az eredményeket szekvencia logó formájában ábrázoltam.

Mint említettem, korábban több más inhibitor váz alkalmazásával is megkíséreltünk szelektív MASP-3 inhibitor kifejlesztetni, de nem jártunk sikerrel. Valószínűnek tartom, hogy azok az inhibitor vázak, amikkel korábban próbálkoztunk, valamilyen nem azonosított szerkezeti inkompatibilitás miatt voltak alkalmatlanok a MASP-3 enzim által támasztott szigorú szelekciós feltételek teljesítésére.

4.2.3. Szelektív MASP-3 inhibitor fehérje előállítása és jellemzése *in vitro*

A MASP-3 által az evolált pozíciókban preferált oldalláncok kis száma és hasonlósága, valamint a preferencia mintázat különösen hidrofób jellege miatt egyetlen inhibitor állítottam elő. A TFMI-3 (TFPI1 D2-based MASP-3 inhibitor) a P3-P4' régióban a MASP-3 által szelektált konszenzus szekvenciát (ICKLFFI) hordozza. A felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance, SPR) mérésekhez és a plazma pull-down kísérletekhez előállítottam a TFMI-3 C-terminálison hemagglutinin (HA) epitóp címkét (YPYDVPDYA) hordozó változatát (TFMI-3_HA) is. A pull-down kísérletekben az inhibitor P1 pozícióban Glu oldalláncot hordozó, a tripszinszerű szubsztrátspecifitású szerin proteázokhoz nem kötő variánsa (TFMI-3_K135E_HA) szolgált kontrollként.

A TFMI-3 variánsokat a TFMI-2 variánsok termeléséhez és tisztításához is alkalmazott eljárással állítottam elő. A fehérjék megfelelő molekulatömegét ESI-MS mérésekkel igazoltuk. Ezeknek a fehérjéknek túl kicsi a szarvasmarha tripszinnel szemben mutatott affinitása ahhoz,

hogy koncentrációjukat tripszinnel szembeni titrálás alapján határozzam meg. Ezért a fehérjék koncentrációját a 280 nm hullámhosszon mutatott elnyelésük alapján állapítottam meg.

Meghatároztam a TFMI-3 K_I értékét a három emberi MASP enzim katalitikus fragmentumával szemben (4. táblázat). A TFMI-3 a MASP-3 enzimet nagy affinitással ($K_I = 11,1$ nM) gátolja, miközben a MASP-1 aktivitására nincs hatással és a MASP-2 enzimmel szemben is kifejezetten alacsony az affinitása. Az első eredmények alapján tehát sikerült egy olyan, hatékony MASP-3 inhibitor előállítanom, ami a másik két MASP enzimet nem gátolja. A TFMI-3_HA a TFMI-3 inhibitorhoz hasonló affinitással gátolja a MASP-3 enzimet.

Inhibitor	Szekvencia (P4-P4')	K_I (nM)		
		MASP-1	MASP-2	MASP-3
TFMI-3	GICKLFFI	N.G.	75000 ± 2000^a	$11,1 \pm 0,8^a$

4. Táblázat - A TFMI-3 K_I értékei az emberi MASP enzimek katalitikus fragmentumaival szemben

^a: Átlag \pm SEM (n = 3)

N.G.: Nincs kimutatható Gátlás

Korábban megjelentek adatok az irodalomban arról, hogy a zimogén MASP-3 fehérjének lehet proteolitikus aktivitása, ezért szerettem volna megállapítani, hogy a TFMI-3 köt-e a zimogén MASP-3 enzimhez. A zimogén MASP-3 nem hasít szintetikus szubsztrátokat, ezért az enzimaktivitás mérésén alapuló tesztben nem tudtam ezt a kölcsönhatást vizsgálni.

A TFMI-3 aktív és zimogén MASP-3 enzimmel való kölcsönhatását SPR kísérletekben vizsgáltam, amelyek során Kiss Bence volt a segítségemre. A szenzor chip felszínére a HA epitóp címkét felismerő ellenanyagot rögzítettem, majd TFMI-3_HA inhibitor áramoltattam a rendszerben, ami az ellenanyag által megkötődött. Az így előkészített felszínű csatornában ezután az aktív vagy zimogén MASP-3 különböző koncentrációjú oldatait áramoltattam.

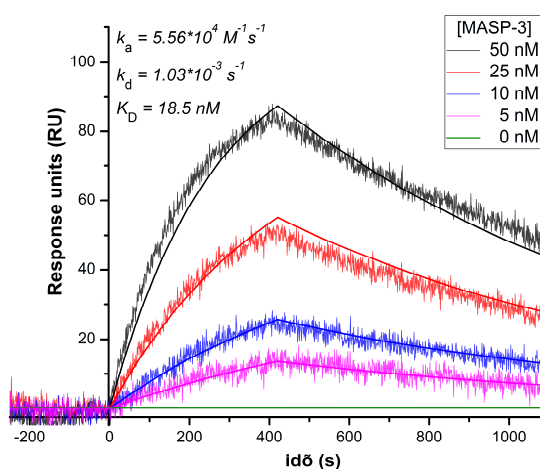
aktív MASP-3 és TFMI-3 kölcsönhatása	
k_a	$5,25 \pm 0,18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
k_d	$9,30 \pm 0,52 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
K_D	$17,7 \pm 0,8 \text{ nM}$

5. Táblázat - Az aktív MASP-3 és a TFMI-3 kölcsönhatásának SPR mérésekben meghatározott kinetikai paraméterei.

A táblázatban bemutatott adatok három mérésben kapott értékek átlagai \pm SEM.

Az aktív MASP-3 enzimmel végzett kísérletek során kapott adatokból az 1:1 Langmuir kötési modell globális illesztésével kaptam meg a kölcsönhatást jellemző k_a , k_d és K_D értékeket. A mérést háromszor végeztem el. Az átlagos adatokat az 5. Táblázatban mutatom be. A 21. Ábrán az egyik mérés során kapott szenzogramokat, az adatokra illesztett kölcsönhatási modellt és a mérésből kapott kinetikai paramétereket mutatom be. A kapott átlagos K_D (17,7 nM) az enzimaktivitás alapú, oldatfázisban meghatározott K_i értékkel (11,1 nM) jó egyezést ad.

A zimogén MASP-3 nem kötött a felkínált TFMI-3_HA inhibitorhoz még 10 μ M koncentrációban áramoltatva sem, vagyis a TFMI-3 a zimogén MASP-3 fehérjéhez nem köt számottevő affinitással. Ez azt is jelenti, hogy a TFMI-3 segítségével szelektíven vizsgálhatók az aktív MASP-3 enzim proteolitikus aktivitáson alapuló funkciói.



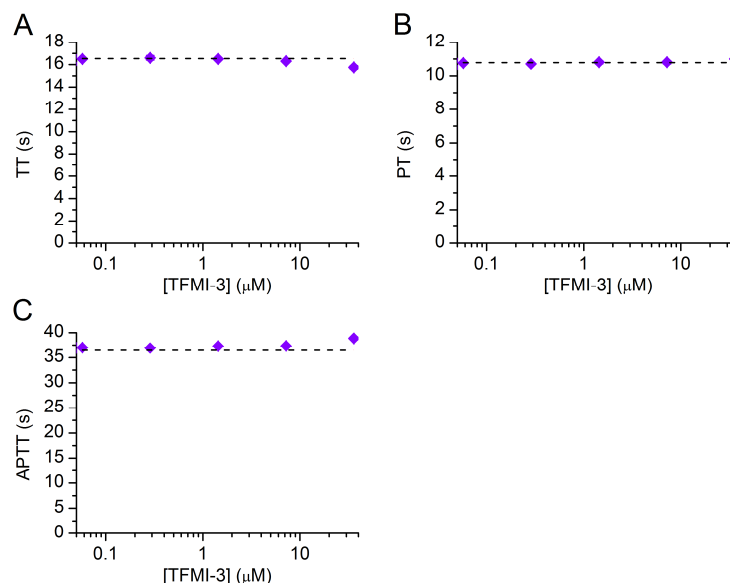
21. Ábra - A TFMI-3 és az aktív MASP-3 kölcsönhatásának vizsgálata SPR kísérletekben

Párhuzamosan áramoltattam MASP-3 katalitikus fragmentum különböző koncentrációjú oldatait immobilizált TFMI-3_HA inhibitorot tartalmazó analit csatornák felszínén. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet során kapott szenzogramokat mutatok be. A folytonos vonalak az adatokra globálisan illesztett 1:1 Langmuir kölcsönhatási modellt reprezentálják.

4.2.4. A TFMI-3 nem gátolja a véralvadást

A TFMI-2 variánsokkal azonos módon, ugyanabban a három véralvadási tesztben (TT, PT, APTT) vizsgáltuk, hogy a TFMI-3 befolyásolja-e a véralvadást. A kísérleteket Szász Róbert és Pál Gábor végezte el az általam előállított fehérjével. A TFMI-3 legmagasabb alkalmazott koncentrációja 36 μ M volt, ami a MASP-3 enzimmel szemben mutatott K_i értékénél több, mint három nagyságrenddel magasabb. Az inhibitor egyik tesztben sem befolyásolta az alvadási időt

(22. Ábra), vagyis nem gátolja a véralvadási kaszkád hat szerin proteáz enzimének (trombin, fVIIa, fIXa, fXa, fXIa, fXIIa) egyikét sem számottevő affinitással.

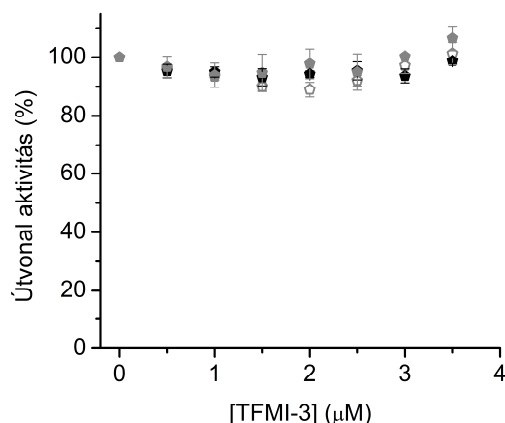


22. Ábra - A TFMI-3 véralvadásra gyakorolt hatása három standard alvadási tesztben

A TFMI-3 (♦) véralvadásra gyakorolt hatása standard véralvadási tesztekben: (A) TT, (B) PT és (C) APTT. Az inhibitor nincs hatással a véralvadási időkre. A szimbólumok két mérés átlagát jelölik, a hibaszalók a SEM értéket reprezentálják. A kontroll értékeket hat, inhibitor nem tartalmazó plazmával végzett mérésekből átlagoltam, és vízszintes szaggatott vonalként ábrázoltam.

4.2.5. A TFMI-3 nem befolyásolja a komplementrendszer aktivációját

A TFMI-3 komplement aktivációra gyakorolt hatását többféle komplement ELISA tesztben vizsgáltam, amelyek mind azonos eredményre vezettek. Ezek közül a Wieslab teszt eredményét mutatom be (23. Ábra). Az inhibitor legmagasabb koncentrációja 3,5 μM volt, ami a TFMI-3 MASP-3 enzimmel szemben mutatott affinitásánál több, mint két nagyságrenddel magasabb. Emberi szérumban a TFMI-3 egyik aktivációs útvonal működését sem befolyásolta, ami azt jelenti, hogy legalábbis ebben a legelterjedtebben használt vérkészítményben a MASP-3 nem járul hozzá a komplementrendszer aktiválódásához, az enzimnek ebben a közegben nincs szerepe a komplementrendszer más szerin proteázainak aktiválásában, inaktiválásában, vagy bármely útvonal szabályozásában. Az eredményekből az is következik, hogy a TFMI-3 a MASP-3 enzimen kívül nem gátol más komplement szerin proteázt számottevő hatékonysággal.



23. Ábra - A TFMI-3 hatása a három komplement útvonalra Wieslab tesztben

A TFMI-3 egyaránt hatástalan volt a lektin út (fekete ötszögek), a klasszikus út (üres szürke ötszögek) és az alternatív út (teli szürke ötszögek) aktivitására a Wieslab tesztben. Minden szimbólum három mérés átlagát jelöli, a hibaszívek a SEM értéket reprezentálják.

4.2.6. A TFMI-3 egyedül a MASP-3 enzimhez köt emberi plazmában

A TFMI-3 inhibitorral plazma pull-down kísérleteket végeztünk. Ezek során arra voltunk kíváncsiak, hogy a TFMI-3 a MASP-3 mellett köt-e más enzimekhez vagy fehérjékhez a plazmában. A kísérleteket Körtvély Előd végezte el a Tübingeni Egyetemen, az általam előállított rekombináns fehérjékkel. A kísérletek során Előd TFMI-3_HA inhibitort adott a plazmához, majd inkubálást követően a HA epitóp címkéhez kötő ellenanyagokkal borított mágneses gyöngyökkel izolálta az inhibitort és az inhibitor által megkötött fehérjéket. A kihalászott fehérjéket a gyöngyöktől HA peptiddel elvégzett, 5 perces és azt követő 90 perces kompetitív elúcióval választotta el, majd tripszinnel való fragmentálást követően tömegspektrometriás módszerrel azonosította. A specifikus negatív kontroll kísérletekben a P1 pozícióban Glu oldalláncot hordozó, ezáltal a tripszinszerű enzimekhez nem kötő TFMI-3_K135E_HA volt a plazmához adva. Az abszolút negatív kontroll kísérletekben nem volt inhibitor a mintákban.

Mindössze két fehérje volt, ami kizárólag a TFMI-3_HA inhibitort tartalmazó mintában volt kimutatható. Ezek a MASP-3 enzim, és a fikolin H (fikolin-3), az a mintázatfelismerő molekula, amiről már ismert volt, hogy a vérben a MASP-3 túlnyomórészt ezzel alkotott komplexben kering (153). A két fehérje azonosítása a 90 perces kompetitív elúciót követően öt, illetve hét peptid alapján történt (6. Táblázat, F4. Táblázat). Az öt azonosított MASP peptid közül négy a MASP-3 enzim egyedi szerin proteáz doménjéből származik, és csupán egy peptid származik a MASP-1

enzimmel közös öt N-terminális doménből (F3. Ábra). Az eredmények alapján a TFMI-3 kizárólag a MASP-3 enzimez köt számottevő affinitással a plazma proteázok közül, vagyis monospecifikus.

Fehérje (UniProt ID)	A tripszin kezelést követően MS módszerrel azonosított egyedi peptidek száma					
	Inhibitormentes gyöngyök		TFMI-3_K135E_HA gyöngyök		TFMI-3_HA gyöngyök	
	5' elúció	90' elúció	5' elúció	90' elúció	5' elúció	90' elúció
MAASP-3 (P48740-2)	0	0	0	0	0	5
fikolin H (O75636-1)	0	0	0	0	2	7

6. Táblázat - A TFMI-3 plazma pull-down kísérletek eredményei

A TFMI-3 inhibitorral mindössze két fehérjét izoláltunk emberi plazmából: a MASP-3 enzimet és a MASP-3 enzimmel komplexet alkotó fikolin H mintázatfelismerő molekulát. Ez igazolja, hogy az inhibitor a plazma proteázok közül kizárólag a MASP-3 enzimhez köt nagy affinitással.

4.2.7. A MASP-3 a zimogén D-faktor egyedüli aktivátora nyugvó emberi vérben

Dobó József (MTA TTK) korábban kifejlesztett egy olyan tesztet, amellyel követhető a zimogén D-faktor szérum, illetve plazma mintákban végbemenő aktiválódása (2.2 Fejezet). Ebben a tesztben is megvizsgáltuk, hogy a csak a MASP-3 enzimet gátló TFMI-3 hozzáadása befolyásolja-e a D-faktor aktiválódásának ütemét. A kísérleteket Oroszlán Gábor végezte el az általam előállított inhibitor fehérjével. Az eredményeket a 7. Táblázatban és a 24. Ábrán mutatom be. A kísérleteket háromféle, különböző véralvadásgátló kezeléssel előállított plazma mintával is elvégeztük. A TFMI-3 1000 nM koncentrációban alkalmazva egyaránt teljes mértékben gátolta a zimogén D-faktor aktiválódását a citráttal kezelt, az EDTA kezelt és a hirudinnal kezelt plazma mintákban (24B.,D.,F. Ábra). Citráttal kezelt plazmában már 100 nM koncentrációban alkalmazott TFMI-3 is jelentős mértékben lassította a D-faktor aktiválódás ütemét. 100 nM TFMI-3 koncentráció mellett a MASP-3:TFMI-3 kölcsönhatás paraméterei alapján közel teljes MASP-3 gátlást vártunk, míg 1000 nM TFMI-3 koncentráció mellett teljes MASP-3 gátlásra számítottunk. A kapott eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy nyugvó, azaz sem véralvadással, sem komplement-, vagy kontaktrendszer aktiválódással nem befolyásolt vérben a MASP-3 a D-faktor kizárólagos aktivátora. Ez azt jelenti, hogy az alternatív út működése alapvetően egy, a lektin útvonalhoz sorolt enzim aktivitásától függ, a két útvonal kiindulási pontjaiktól kezdve össze van kapcsolva.

Minta típusa	[TFMI-3] (nM)	Felezési idő	az aktivált D-faktor aránya a 24 órás mintában ^d
citráttal kezelt plazma ^a	0	4,3 ± 0,3 órá ^b	≥95%
	100	≥2 nap ^c	~25%
	1000	≥1 hét ^c	≤10%
EDTA kezelt plazma ^a	0	3,8 ± 0,3 órá ^b	≥95%
	1000	≥1 hét ^c	≤10%
hirudinnal kezelt plazma ^a	0	2,3 ± 0,3 órá ^b	≥95%
	1000	≥1 hét ^c	≤10%
szérum ^a	0	2,2 ± 0,3 órá ^b	≥95%
	1000	~40 órá ^c	~35%

7. Táblázat - A fluoreszcensen jelölt zimogén D-faktor felezési ideje és az aktív D-faktor aránya a kontroll és a TFMI-3 inhibitort tartalmazó mintákban

^a: 10 egészséges önkéntestől származó kevert minta

^b: Három kísérlet átlaga

^c: Az aktivált D-faktor 24 órás mintában mutatott aránya alapján, exponenciális bomlást feltételezve számított értékek.

^d: A denzitometriás módszerrel meghatározott fehérje sáv intenzitások alapján becsült értékek.

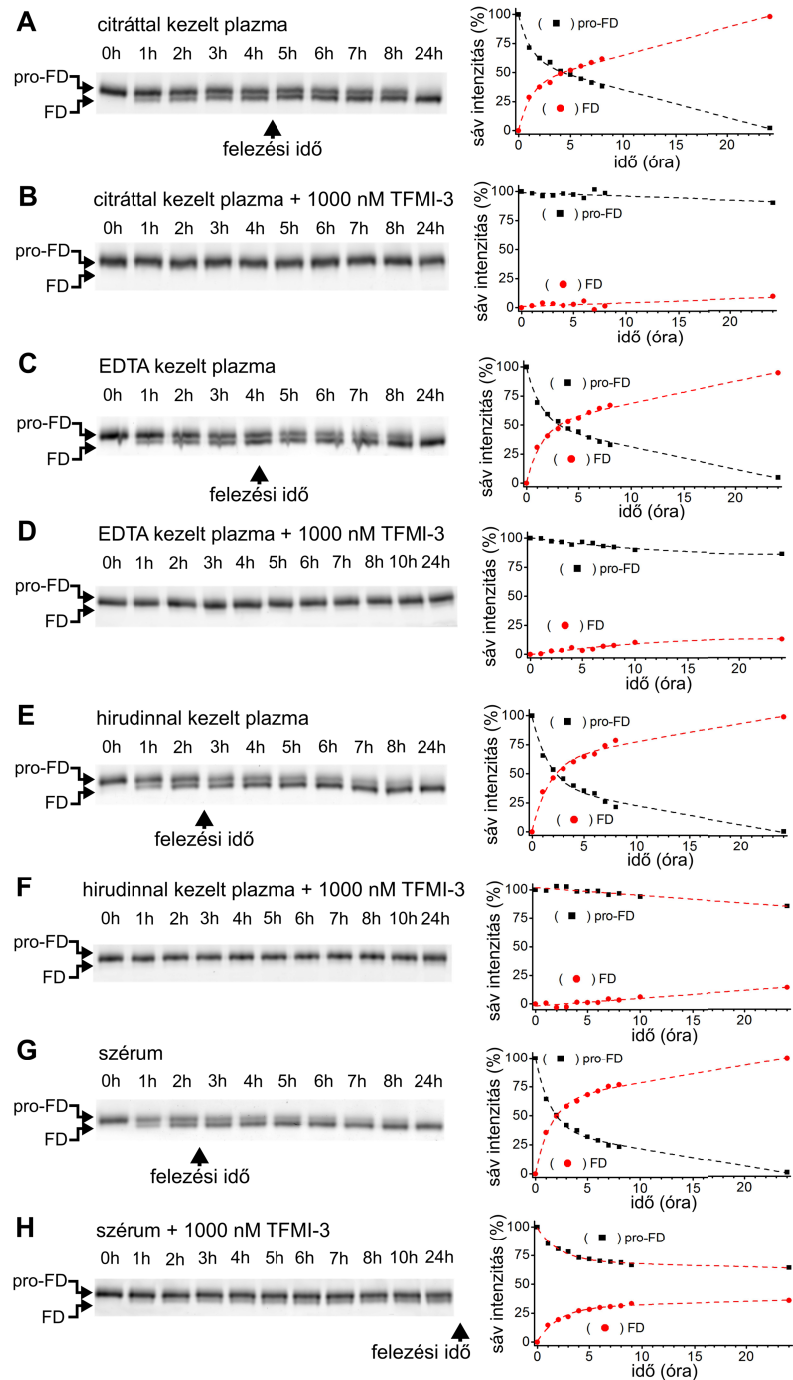
Az eredmények arra is utalnak, hogy nyugvó vérben a MASP-3 molekulák legalább egy része aktivált állapotban kering. Más kutatócsoportok korábban plazmából izolált MBL:MASP komplexek redukáló SDS-PAGE elválasztást követő Western blot vizsgálatával a MASP-3 enzimnek csak az aktivált formáját detektálták (57, 154), azonban elképzelhető volt, hogy az enzim a minták előkészítése során aktiválódott.

A szérummal elvégzett kísérletben azt kaptuk, hogy az inhibitort 1000 nM koncentrációban alkalmazva a D-faktor aktiválódás folyamata nagymértékben lassult, de a plazma kísérletekben látott teljes gátlást nem értük el (24H. Ábra, 7. táblázat). Ez arra utal, hogy a szérumban van egy vagy több olyan, a D-faktor aktiválását katalizáló aktív enzim, ami az összes plazma preparátumból hiányzik, és amit a TFMI-3 nem gátol. Ilyen enzim lehet például a trombin, ami *in vitro* képes a zimogén D-faktor aktiválására (134), és amit a TFMI-3 igazoltan nem gátol.

Hirudinnal kezelt plazmában a zimogén D-faktor felezési ideje kisebb, mint a Ca²⁺ megvonással készített plazma preparátumokban, és szinte teljesen azonos a szérumban kapott értékkel (24A.,C.,E.,G. Ábra, 7. Táblázat). A hirudinnal kezelt plazma hasonlít a szérumhoz: ez a két preparátum Ca²⁺-ionokat tartalmaz, ezáltal a véralvadási kaszkád a vér levétele során aktiválódik. A véralvadás folyamata a szérum preparálása során végbemegy, a szérumban aktivált

véralvadási proteázok vannak jelen. A hirudinnal kezelt plazmában a trombin gátlása miatt az alvadás nem megy végbe, de a kaszkádban a trombin feletti szinten lévő alvadási proteázok ebben a preparátumban is aktivált állapotban lehetnek. A D-faktor aktiválódásnak a monospecifikus TFMI-3 általi teljes gátlása hirudinnal kezelt plazmában azt mutatja, hogy a trombin feletti szinten lévő alvadási proteázok nem aktiválják a D-faktort. A rövidebb felezési időt tehát nem közvetlenül ezeknek a proteázoknak az aktivitása eredményezi, hanem az, hogy ezekben a mintákban nagyobb a MASP-3 aktivitás. A jelenségre legalább három magyarázat merül fel: *i)* a Ca^{2+} -ionok közvetlenül befolyásolják a MASP-3 általi zimogén D-faktor aktiválás hatékonyságát, vagy *ii)* a Ca^{2+} -ionok közvetlenül befolyásolják a MASP-3 proenzimet aktiváló enzimet, vagy enzimeket, vagy *iii)* a szérumban és a hirudinnal kezelt plazmában aktiválódó véralvadási kaszkád vagy gyulladásos folyamatok egyes enzimei képesek lehetnek a MASP-3 aktiválására.

Megvizsgáltuk, hogy a Ca^{2+} -ionok befolyásolják-e a MASP-3 általi D-faktor aktiválást, vagy a MASP-3:TFMI-3 kölcsönhatást. A MASP-3 általi D-faktor aktiválás üteme *in vitro* azonos volt Ca^{2+} -ionokat tartalmazó és Ca^{2+} -mentes pufferben, ezt a kísérletet Oroszlán Gábor végezte el. A MASP-3:TFMI-3 kölcsönhatás Ca^{2+} -mentes pufferben, oldatfázisú enzimgátlási tesztben meghatározott K_i értéke ($9,9 \pm 0,6$ nM) nagyon közel van a Ca^{2+} -ionokat tartalmazó pufferben kapott adathoz ($11,1 \pm 0,8$ nM). A Ca^{2+} -ionok tehát nem befolyásolják közvetlenül a MASP-3 enzim működését. Ez alapján a zimogén D-faktor szérumban és hirudinos plazmában tapasztalt rövidebb felezési ideje annak lehet köszönhető, hogy az aktív MASP-3 koncentrációja ezekben a preparátumokban valamilyen aktivátor(ok) jelenléte miatt magasabb. Ennek feltétele, hogy nyugvó vérben a MASP-3 molekuláknak csak egy része legyen aktív formában.



24. Ábra - A TFMI-3 gátolja a zimogén D-faktor aktiválódását szérumban és plazma mintákban

Az ábra bal oldalán reprezentatív gélek szerepelnek, a jobb oldalon a bemutatott gélek kiértékelése látható. A zimogén D-faktor pro-FD, az aktivált D-faktor FD elnevezéssel szerepel. A D-faktor aktiválódás folyamata inhibitor mentes (A) citráttal kezelt plazmában, (C) EDTA kezelt plazmában, (E) hirudinnal kezelt plazmában és (G) szérumban. 1000 nM TFMI-3 teljes mértékben meggátolja a zimogén D-faktor aktiválódását (B) citráttal kezelt plazmában, (D) EDTA kezelt plazmában és (F) hirudinnal kezelt plazmában, és jelentős mértékben lassítja a folyamatot (H) szérumban.

4.2.8. Konklúzió

A MASP-3 fiziológiai szubsztrátjának azonosítását célzó kutatások specifikus MASP-3 inhibitor híján ellentmondásos, illetve közvetett eredményekre vezettek. Ezek az eredmények ugyanakkor valószínűsítették, hogy a MASP-3 enzimnek szerepe van a D-faktor aktiválásában.

A MASP-3 funkciójának tisztázása érdekében irányított evolúcióval létrehoztam, majd jellemeztem az első kanonikus, nagy affinitású és monospecifikus MASP-3 inhibitor, a TFMI-3 fehérjét. A MASP-3 inhibitor birtokában lehetőségünk nyílt a MASP-3 szerepének közvetlen vizsgálatára. ELISA kísérletekben kimutattam, hogy szérumban a MASP-3 nem járul hozzá egyik komplement útvonal aktivitásához sem, és nem játszik szerepet a komplement aktivitás szabályozásában. Ez összhangban van a többi eredménnyel, hiszen szérumban a D-faktor már eleve jelentős részben a MASP-3 által aktivált állapotban van jelen, ezért a MASP-3 gátlásának nincs következménye a komplementrendszer aktivitására nézve.

A TFMI-3 minden plazma preparátumban teljes mértékben gátolta a D-faktor aktiválódás folyamatát, bizonyítva, hogy a MASP-3 a zimogén D-faktor kizárólagos aktivátora nyugvó vérben. Ezt az eredményt később több kutatócsoport is alátámasztotta. Katalitikusan inaktív MASP-3 enzimet tartalmazó, vagy MASP-3 fehérjét egyáltalán nem tartalmazó emberi és egér mintákban a D-faktor aktiválása nem megy végbe, viszont rekombináns MASP-3 hozzáadásával az alternatív út működése helyreállítható (61). Amerikai kutatók japán és dán kollégáikkal közösen a vérükben zimogén D-faktort tartalmazó, alternatív út hiányos MASP-1/3^{-/-}D-faktor^{+/+} egerekbe MASP-1/3^{+/+}D-faktor^{-/-} egerek máját ültették. Azt tapasztalták, hogy a műtét után öt héttel az egerek vérében aktív D-faktor keringett, és az alternatív út működése normalizálódott (155). A legfrissebb eredményeket Teizo Fujita kutatócsoportja mutatta be a közelmúltban (156). CRISPR/Cas9 genomszerkesztési eljárással sikerült létrehozniuk olyan egereket, amelyekben csak a MASP-1 (MASP-1^{-/-}) vagy csak a MASP-3 (MASP-3^{-/-}) enzim nem termelődik. Kimutatták, hogy a MASP-1^{-/-} egérben nincs lektin út aktivitás, viszont működik az alternatív út, míg a MASP-3^{-/-} egérben nincs alternatív út aktivitás, viszont a lektin út működőképes. Vagyis a két enzim egymástól függetlenül tölti be a szerepét a lektin illetve az alternatív útvonalban.

Ezek az eredmények igazolják, hogy a korábbi eredmények alapján feltételezett kapcsolat a komplementrendszer lektin és alternatív aktivációs útvonalai között valóban létezik, ráadásul meghatározó: az alternatív út működése alapvetően egy másik útvonalhoz sorolt enzim, a MASP-3 aktivitásától függ (25. Ábra). Ez megkérdőjelezi, hogy az alternatív út a komplementrendszer

The diagram illustrates the activation of the complement system through two main pathways: the Lektin út (Lectin pathway) and the Alternatív út (Alternative pathway).

Lektin út (Lectin pathway): This pathway is initiated by the binding of MBL (Mannan-binding lectin), Ficolin-1, -2, -3, or Kolektin-10, -11 to a **Mikrobiális felszín** (Microbial surface). This leads to the activation of **MASP-1**, **MASP-2**, and **MASP-3**. **MASP-2** cleaves **C4** into **C4a** and **C4b**, and **C2** into **C2a** and **C2b**. **C4a** and **C2a** are anaphylatoxins. **C4b** and **C2b** form the **C3 konvertáz** (C3 convertase) on the surface, which cleaves **C3** into **C3a** and **C3b**. **C3a** is an anaphylatoxin, and **C3b** is an opsonin. The **C3 konvertáz** is also regulated by **CPN** and **CD55**.

Alternatív út (Alternative pathway): This pathway is initiated by the cleavage of **C3(H₂O)** into **B-factor** and **D-factor**. **B-factor** is cleaved into **Ba** and **Bb**. **Bb** is an opsonin. **D-factor** is cleaved into **D3b** and **B-factor**. **B-factor** is cleaved into **Ba** and **Bb**. **Bb** is an opsonin. **Bb** and **C3b** form the **C3 konvertáz** (C3 convertase) on the surface, which cleaves **C3** into **C3a** and **C3b**. **C3a** is an anaphylatoxin, and **C3b** is an opsonin. The **C3 konvertáz** is also regulated by **H-faktor** and **I-faktor**.

A MASP-3 révén a lektin út és az alternatív út között alapvető, meghatározó fontosságú kapcsolat áll fent, mert nyugvó körülmények között kizárólag a MASP-3 felelős a zimogén D-faktor aktiválásáért és ezáltal az alternatív út működőképességének biztosításáért.

72

hatása miatt. Ennek feltétele, hogy a MASP-3 molekuláknak csak egy része legyen aktivált állapotban nyugvó vérben. Gál Péter kutatócsoportja Oroszlán Gábor és Dobó József meghatározó szerepvállalásával (157), valamint egy dán kutatócsoport (61) egyaránt megerősítette, hogy a MASP-3 molekulák számottevő, de nem a teljes mennyisége kering aktivált állapotban. Az aktivált forma nagyarányú előfordulása azért lehetséges, mert a MASP-3 enzimnek nincs fiziológias inhibitora, ami megakadályozná az aktív forma felszaporodását. A MASP-3 aktiválásának fiziológias mechanizmusa egyelőre nem ismert.

Szérumban a TFMI-3 alkalmazásával sem lehetett tökéletesen gátolni a D-faktor aktiválódását. Ez arra utal, hogy a gyulladásos és/vagy véralvadási proteázok között van legalább egy, a D-faktor aktiválásra képes enzim is. Ilyen enzim lehet a trombin, ami a D-faktor aktiválására képes, és amit a TFMI-3 nem gátol.

Ma már az is ismert, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben egészséges emberek vére is tartalmaz kimutatható mennyiségű zimogén D-faktort (61).

Ezekből a saját és irodalmi eredményekből a következő kép rajzolódik ki. Egészséges, nyugvó állapotban a fiziológias inhibitorral nem rendelkező MASP-3 jelentős része eddig nem azonosított aktivátor(ok) működése miatt aktív formában van jelen a vérben, és a D-faktor aktiválása révén folyamatosan biztosítja az alternatív út működőképességét. Fertőzés vagy sérülés esetén, a gyulladásos és alvadási proteázok aktiválódnak, amelyek aktiválják a még zimogén MASP-3 készletet, ezáltal tovább növelve a D-faktor aktiválás hatékonyságát. Az eredményeink alapján a trombin képes lehet közvetlenül is aktiválni a D-faktort. Ez magyarázhatja, hogy MASP-3 hiányos emberi és egér szérumban is tapasztalható gyenge alternatív út aktivitás: a trombin a minták előkészítése során aktiválhat annyi D-faktort, ami elegendő ahhoz, hogy az kimutatható alternatív út aktivitást eredményezzen a kísérletekben.

Végül, de nem utolsónak sorban az eredményeink alapján a MASP-3 gyógyszer-célpont lehet az alternatív út aktivitásával összefüggő betegségek kezelésében. Egérben és makákóban is kimutatták, hogy a MASP-3 specifikus ellenanyaggal való gátlása hatására csökken az alternatív út aktivitása, és nő a zimogén D-faktor aránya a vérben (94). A D-faktor és a MASP-3 gátlásának hasonló hatásai lehetnek, és a két fehérje koncentrációja is hasonló a vérben. Viszont a D-faktor életideje nagyon alacsony, és ennek megfelelően lecserélődési üteme rendkívül magas: a teljes D-faktor készlet néhány óránként lecserélődik. A sokkal nagyobb méretű MASP-3 életideje valószínűleg sokkal hosszabb, ami a D-faktornál kedvezőbb gyógyszer-célponttá teheti.

5. Anyagok és módszerek

Az általános vegyszereket a Sigma-Aldrich, Merck és VWR cégektől szereztük be. A molekuláris biológiai reagensek a Thermo Fisher Scientific és New England Biolabs (NEB) cégektől származtak. A módszertani fejezetben azonosítom azokat a vegyszereket, reagenseket és eszközöket, amelyek nem triviálisan helyettesíthetők. A munka során létrehozott vektorok, valamint az irányított evolúciós kísérletek után azonosított enzimködő klónok DNS szekvenciáját Sanger szekvenálással ellenőriztem. A szekvenáló reakciókat magam végeztem ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit-tel, a gyártó leírása szerint. A reakciók termékeit a Biomi Kft. futtatta meg kapilláris gélelektroforézissel ABI 3700 készüléken. A szintetikus DNS molekulák (szintetikus gének, oligonukleotidok) szekvenciáit a Függelékben az F1. Táblázat tartalmazza.

5.1. Rekombináns MASP fragmentumok és D-faktor

A kísérletek során *E. coli* sejtekben előállított rekombináns MASP katalitikus fragmentumokat használtam. Az enzimeket Gál Péter kutatócsoportjának tagjai, Balczerné Júlcsi és Dobó József állították elő az MTA TTK Enzimológiai Intézetében.

Az emberi MASP-1, MASP-2 és MASP-3 katalitikus fragmentumok előállításának eljárását Gál Péter csoportjában fejlesztették ki, és az az általuk már közölt eljárásokkal történt (10, 88, 134). A patkány MASP-2 katalitikus fragmentum klónozása, termelése és tisztítása az emberi MASP-2 katalitikus fragmentummal azonos eljárás szerint zajlott (10). A patkány MASP-2 Gln298-Phe685 szakaszát klónozták a vektorba. A rekombináns fehérje klónozási maradékként egy extra Met-Thr dipeptidet tartalmaz az N-terminálisán.

A kísérletek során alkalmazott zimogén D-faktort Oroszlán Gábor állította elő bakulovírus-rovarsejt expressziós rendszerben (134). A fluoreszcensen jelölt zimogén D-faktort szintén Oroszlán Gábor preparálta (134).

5.2. Ecotin génkiütött *E. coli* törzsek létrehozása

Az irányított evolúciós kísérletek és a különböző inhibitor variánsok előállítása során problémát jelenthetne, ha az *E. coli* sejtek a genomjukban kódolt génről ecotint termelnének. Ennek kiküszöbölésére Boros Eszterrel eltávolítottuk a BL21 Star (DE3) (Thermo Fisher Scientific) és az XL1 Blue (Agilent) törzsek genomjából az ecotin génjét. Az ecotin gént a

klóramfenikol rezisztenciát biztosító klóramfenikol acetil-transzferáz génre cseréltük. A munka során Datsenko és Wanner leírását követtük (142). A munka során használt vektorokat Sahin-Tóth Mikós bocsátotta rendelkezésünkre.

A génkiütést a λ fág Red rekombinááz rendszer fehérjéit és a RecA fehérjét kódoló pKD46-RecA (Nature Technology Corporation) plazmid felhasználásával végeztük. A pKD46-RecA plazmid kis kópiaszámú, replikációja hőmérséklet-érzékeny: 30°C-on normális módon replikálódik, viszont 42°C-on már nem másolódik, az utódsejtek nagy része már nem hordozza.

A plazmidot az XL1 Blue sejtekbe kémiai transzformálással, míg a BL21 sejtekbe elektroporálással juttattuk be. Egyedi transzformált kolóniákat növesztettünk LB tápoldatban 30°C-on 100 μ g/mL ampicillin és 1 mM arabinóz mellett. A rekombinációért felelős fehérjék az arabinózzal indukálható, AraBAD promóterrel szabályozott génekről termelődnek. A log-fázisú sejteket ($O.D._{600\text{ nm}} = 0,5$) centrifugáltuk és háromszor mostuk steril 10%-os glicerinnel. Így olyan elektrokompetens sejteket kaptunk, amelyek már tartalmazták a rekombinációért felelős fehérjéket. A sejteket egy olyan PCR termékkel elektroporáltuk, amelynek végei 40 bp hosszán megegyeznek az ecotin gén kódoló szakaszának végeivel, és ami tartalmazza a klóramfenikol acetil-transzferáz gént.

Az elektroporált sejteket egy órán át növesztettük 37°C-on LB tápoldatban, majd 15 μ g/ml klóramfenikolt tartalmazó LB/agar lemezen szélesztettük és 42°C-on növesztettük. Egyedi klónok ampicillin-érzékenységen keresztül ellenőriztük, hogy azok tartalmazzák-e a pKD46-RecA plazmidot. A rekombináns (Δ eco) klónokat PCR reakcióval és DNS szekvenálással ellenőriztük, valamint megállapítottuk, hogy a rekombináns sejtek periplazmájának tripszingátló képessége jelentősen elmarad a kiindulási törzshöz képest, ami az ecotin hiányára utal.

5.3. A fágbemutató műveletei

5.3.1. A TFPI1 D2 megjelenítése a bakteriofág felszínén

A TFPI1 D2 megjelenítéséhez készített fágmid vektor alapjául a pSFMI-prolib (37) vektor szolgált. Az XhoI helyet HindIII hellyel helyettesítettük, a KpnI és az egyik SacI helyet megszüntettük, valamint létrehoztunk egy Kpn2I és egy EcoRI helyet. Az így kapott vektorba klónoztam a TFPI1 D2-t, a szignálszekvenciát is hordozó teljes hosszúságú TFPI1 121-178 szakaszát kódoló DNS szakaszt (F1. Táblázat), amit a Thermo Fisher Scientific cégtől szereztem

be. E számozás szerint a 135. pozíció a P1. Az így kapott pTFPI1 D2-pro-lib vektor által kódolt fúziós fehérje funkcionális részei az N-terminálistól a C-terminális felé a FLAG epitóp címke, a TFPI1 D2 és a p8 burokfehérje, amelyeket hosszú Ser/Gly linkerek választanak el egymástól. A konstrukciót a Függelékben, az F1. Ábrán is bemutatom.

A fehérje fágfelszínen való megjelenését a fágok FLAG epitóp címkét (DYKDDDDK) felismerő ellenanyaghoz (Sigma-Aldrich F3165) való kötési képessége alapján igazoltam. A megjelenített TFPI1 D2 natív, a célenzimhez való kötéshez megfelelő konformációját szintén ELISA tesztben igazoltam szarvasmarha tripszinhez (Sigma-Aldrich T1426) való kötés alapján. Ezt az tette lehetővé, hogy a TFPI1 D2 nagy affinitással ($K_I = 15 \text{ pM}$) köti a szarvasmarha tripszint.

5.3.2. Kunkel templát előállítása

A fágmid vektort *E. coli* CJ236 (NEB) sejtekbe juttattam. Ez a törzs nem rendelkezik dUTPáz és uracil-DNS glikoziláz enzimekkel, ezért timin helyett uracilt épít a DNS láncba. A fágmidot tartalmazó sejteket M13KO7 helper fággal (NEB) fertőztem, a termelődött fágokat PEG/NaCl módszerrel tisztítottam a felülúszóból, majd Qiagen QIAprep Spin M13 kittel (#27704) izoláltam a fágokból az egyszálú fágmid DNS-t, ami a mutagenézis során templátként szolgált.

5.3.3. Könyvtárkészítés

A könyvtárkészítés során Sidhu és munkatársai leírását követtem (158). A könyvtárat egymást követő Kunkel mutagenézis (159) lépésekben hoztam létre. Az első reakcióban az evolválendő pozíciókban a vad típusú kodonokat TAA stop kodonokra cseréltem. A könyvtárat a második, kombinatorikus mutagenézis reakcióban állítottam elő, amiben a stop kodonokat hordozó vektor szolgált templátként. Így elkerülhető, hogy a könyvtár vad típusú fehérjét bemutató fágokat tartalmazzon háttérként. Az oligonukleotidokat az F1. Táblázatban bemutatom.

A Kunkel mutagenézis reakciókhoz az oligonukleotidokat T4 polinukleotid kinázzal kezeltem, a Kunkel templáthoz hibridizáltattam, majd T7 DNS polimeráz (NEB M0274) és T4 DNS ligáz (NEB M0202) enzimekkel duplaszálú DNS molekulákat hoztam létre. Az így kapott kétszálú vektor heteroduplex: egyik szála vad típusú, uracil tartalmú és rendelkezik a gazdasejtre jellemző metilációs mintázattal, míg a másik szál mutáns, uraciltól mentes és nem metilált. A heteroduplex DNS molekulákkal transzformált, dUTPáz és uracil-DNS glikoziláz enzimekkel rendelkező sejtek az esetek kb. 80%-ában a mutációkat tartalmazó, nem metilált, de uracilt sem tartalmazó szál alapján javítják a nem megfelelően párosodott bázisokat.

A stop templát készítése során a Kunkel mutagenézis termékét XL1 Blue Δ eco sejtekbe transzformáltam. A második, kombinatorikus mutagenézis reakció termékét Qiagen QIAquick Gel Extraction Kittel (#28704) tisztítottam, és SS320 (Lucigen) sejtekbe elektroporáltam.

A könyvtár diverzitásának megállapításához az elektroporált sejteket a fágmid jelenlétére szelektáló, 100 μ g/mL ampicillint tartalmazó LB/agar lemezen titráltam. A könyvtár 5×10^8 klónt tartalmazott. A könyvtárral elektroporált SS320 kultúrát M13KO7 helper fággal fertőztem és egy éjszakán át (O/N) növesztettem. A következő nap az inhibitor-fág könyvtárat PEG/NaCl kicsapással izoláltam.

5.3.4. A TFPI1 D2 könyvtár szelekciója emberi és patkány MASP-2, illetve emberi MASP-3 kötésre

Mindhárom esetben három szelekció-szaporítás ciklust végeztem Sidhu és munkatársai leírása (158) alapján. A katalitikus fragmentumok 2-2 μ g mennyiségét (20 μ g/mL, 100 μ L/mintahely) immobilizáltam Nunc MaxiSorp 96 mintahelyes ELISA lemezek felszínén két órán keresztül, szobahőmérsékleten, rázatás mellett. Az aktív emberi és patkány MASP-2 enzimet 200 mM nátrium-karbonát pH 9,4 pufferben vittem a lemezre, míg az aktív emberi MASP-3 enzimet 10 mM Tris, 10 mM nátrium-foszfát, 155 mM NaCl pH 8,0 pufferben immobilizáltam. Az immobilizált enzimeket tartalmazó mintahelyeket és azokkal megegyező számú kontroll mintahelyet blokkoltam 200 μ L/mintahely 5 mg/mL BSA-t tartalmazó PBS oldattal szobahőmérsékleten, 2 órán keresztül, rázatás mellett. A mintahelyekre a PBS, 5 mg/mL BSA, 0,5 % Tween 20 (PBT puffer) oldatban felvett inhibitor-fág könyvtár 100-100 μ L mennyiségét vittem fel, majd a lemezt 3 órán át szobahőn inkubáltam rázatás mellett. A lemezt mostam PBS, 0,5 % Tween 20 oldattal, majd a kikötött fágokat 100 μ L/mintahely 100 mM sósav oldattal eluáltam. Az eluált fág oldatot 1/7 térfogat 1 M Tris bázis hozzáadásával semlegesítettem. A fágokkal nagy feleslegben adott mid-log fázisú XL1 Blue Δ eco sejteket fertőztem. A sejtekből mintát vettem, és a fágmid jelenlétére szelektáló, 100 μ g/mL ampicillint tartalmazó LB/agar lemezekeken meghatároztam az enzimkötésre szelektált és a kontroll mintahelyekről eluált fágok mennyiségét és arányát. Ez megadja, hogy az enzimkötésre szelektált könyvtár milyen mértékben dúsult enzimkötő klónokban. Az enzimkötésre szelektált fágokkal fertőzött sejteket M13KO7 helper fággal felülfertőztem, ezáltal azokat nagy mennyiségben fel tudtam szaporítani a következő szelekciós ciklusra.

5.3.5. Egyedi variánsok enzimkötő képességének ellenőrzése

Fág-ELISA kísérletekben ellenőriztem egyedi fág klónok képességét a szelekció során alkalmazott célenzimhez való kötésre. A kísérletek a szelekcióhoz hasonló módon zajlottak. Az emberi és patkány MASP-2 kötésre való szelekció második és harmadik köréből, valamint az emberi MASP-3 kötésre való szelekció harmadik köréből egyedi fág klónokat szaporítottam. Minden klón ellenőrzéséhez előkészítettem egy célenzimet tartalmazó és egy enzimmentes mintahelyet MaxiSorp 96 mintahelyes ELISA lemezen. A mintahelyek blokkolását követően a klonális fág oldatokat felvittem az enzimet tartalmazó és a kontroll mintahelyre, majd a lemezt rázatás mellett egy órán át inkubáltam szobahőn. A nem-kötött fágokat mosással eltávolítottam, majd HRP-konjugált anti-M13 ellenanyagot (GE Healthcare 27-9421-01) mértem a mintahelyekre. 30 perc után a lemezt mostam, majd a kikötődött fágokat TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin) peroxidáz szubsztrát hozzáadásával mutattam ki. A reakciót 1 M sósav hozzáadásával állítottam le, és meghatároztam a mintahelyek 450 nm hullámhosszon mutatott fényelnyelését. A célenzimhez specifikusan kötőnek azokat a klónokat tekintettem, amelyek legalább háromszor nagyobb fényelnyelést produkáltak a célenzimet tartalmazó mintahelyen, mint az enzimmentes mintahelyen.

5.3.6. Az irányított evolúciós kísérletek eredményeinek ábrázolása

Meghatároztam a klonális fág-ELISA tesztekben specifikus enzimkötőnek talált TFPI1 D2 variánsok DNS szekvenciáját. Az evolált pozíciókban az egyes aminosavak előfordulási gyakoriságát normáltam az NNK kodonkészletben lévő kodonjaik számával, majd létrehoztam az egyes pozíciókban a normálást követően kapott relatív aminosav gyakoriságokat tükröző 100-100 mesterséges szekvenciát. Ezekből a szekvencia sokaságokból szekvencia logókat hoztam létre a WebLogo programmal (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (160). A program az adott pozícióra (i) jellemző entrópia (H) értéket a 20 aminosavra (alanintól [A] triptofánig [W]) a Shannon-féle diverzitás egyenlettel (**(a)**) számítja:

$$\text{(a)} \quad H_{(i)} = -\sum_{b=A}^W f_{(A,i)} \times \log_2 f_{(A,i)} \quad \text{(b)} \quad R_{(i)} = \log_2 20 - H_{(i)}$$

Az oszlopok magasságának (R) bitekben való megadása során a program a maximális oszlop magasságból ($\log_2 20$) levonja az adott pozícióra vonatkozó H értéket (**(b)**). Vagyis az oszlop magassága az adott pozícióban azt fejezi ki, hogy milyen mértékben tér el az aminosavak eloszlása az egyenletestől. Az oszlop magassága egyenletes eloszlás esetén nulla, míg maximálisan

egyenetlen eloszlás esetén maximális. Az egyes aminosavakat jelölő betűk magassága a relatív gyakoriságnak felel meg. Az adott pozícióban leggyakoribb aminosavat jelölő betű van legfelül, a betűk sorrendje a relatív gyakoriságok sorrendjét tükrözi.

5.4. Expressziós vektorok létrehozása a TFPI1 D2 variánsok előállításához

A TFPI1 D2 génjét egy módosított pMal p2G vektorba klónoztam, amit számos inhibitor maltózkötő fehérje fúzióban való előállításához használtunk. Ez a vektor szolgált templátként a TFMI-2a és a TFMI-3 Kunkel mutagenézissel történő előállításához. A TFMI-2b és TFMI-2c génjét megaprimer PCR mutagenézissel hoztam létre, melynek során a TFMI-2a génjét tartalmazó pMal p2G plazmid volt a templát.

A pMal vektorba klónozott inhibitorokból a laboratóriumunkban alkalmazott eljárással csak nagyon kis mennyiségeket tudtam előállítani, sőt, a TFMI-3 variánst ebben a rendszerben nem sikerült termelnem és tisztítanom. Laboratóriumunkban Boros Eszter is szembesült azzal, hogy a proteázköti hurok régióban több mutációt hordozó inhibitorok némelyike nagyon kis mennyiségben és/vagy nem megfelelő minőségben állítható elő. Ezért Eszter egy olyan rendszer fejlesztésébe fogott, ami alkalmas ezeknek a fehérjéknek a nagy mennyiségben és natív térszerkezettel történő előállítására. A fejlesztés során Eszter a következő fejezetben részletezett protokollt alkalmazva megoldotta a TFMI-3 előállítását. Az összes variánst szubklónoztam az általa használt vektorba (pS100A4), és a későbbiekben az általa kidolgozott eljárás szerint tisztítottam az inhibitorokat.

A C-terminálison HA epitóp címkét hordozó TFMI-3 variáns génjét (TFMI-3_HA) PCR reakcióban állítottam elő, majd a pS100A4 vektorba klónoztam. A TFMI-3_HA P1 pozícióban glutamát oldallánccal rendelkező mutánsát (TFMI-3_K135E_HA) „overlap extension” PCR technikával hoztam létre, és szintén a pS100A4 vektorba klónoztam.

Az oligonukleotidokat és szintetikus géneket az F1 Táblázatban mutatom be. Az expresszió során létrejövő fúziós fehérje DNS és aminosav szekvenciáját az F2 Ábrán mutatom be.

5.5. A TFPI1 D2 variánsok bakteriális expressziója és tisztítása

Az S100A4 fehérje expressziót és tisztítást segítő fúziós partnerként való alkalmazását Kiss Bence vetette fel és ő állította elő a pS100A4 vektort. Az emberi S100A4 (C3S, C81S, C86S) fehérjéhez N-terminális irányból egy His₆-címkét, C-terminális irányból pedig a TEV proteáz

felismerő helyét és a fúziós partnerek klónozásához egy rövid multiklónozó helyet kapcsolt, majd ezt a konstrukciót egy pET alapú vektorba, a pBH4-be klónoztam (161).

A megfelelő inhibitor génjét tartalmazó pS100A4 vektorral *E. coli* SHuffle T7 Express (NEB) sejteket transzformáltam. A transzformált sejteket LB, 100 µg/mL ampicillin tápoldatban növesztettem 30 °C-on $O.D_{600\text{ nm}} = 0,8$ értékig, majd 400 µM IPTG hozzáadásával indukáltam a rekombináns fehérje termelődését, ami O/N zajlott 18 °C-on. Másnap a sejteket centrifugálással (7500 g, 5 perc) üleptítettem, majd szuszpendáltam 1/10 kultúra térfogat 50mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10mM imidazol pH 8,0 pufferben (IMAC puffer). A sejteket ultrahangos szonikálással feltártam, majd a sejttörmelékét centrifugálással (48 000 g, 30 perc) elválasztottam az oldott komponensektől. A fúziós fehérjét immobilizált fémion affinitás kromatográfiával (IMAC) izoláltam. Ehhez IMAC pufferrel egyensúlyba hozott, Ni^{2+} -telített BioRad Profinity mátrixot használtam. Alapos mosást (15-20 oszloptérfogat) követően a fúziós fehérjét 250 mM imidazollal kiegészített IMAC pufferrel eluáltam.

A mintát IMAC pufferrel szemben dializáltam, majd a fúziós fehérjét His-címkés TEV proteázzal hasítottam (O/N, 30 °C). A His-címkés S100A4 és TEV proteáz fehérjéket egy második IMAC lépés során távolítottam el: ennek során az inhibitor átesett az oszlopon, míg a His-címkés fehérjék felkötődtek arra. Az átesőből az inhibitorokat RP-HPLC-vel izoláltam, a fehérjéket liofilizáltam, majd vízben feloldottam és 4 °C-on tároltam.

Az inhibitorok helyes molekulatömegét ESI-MS mérésekben igazoltuk. Ezeket a méréseket Kékesi Katalin és Shlosser Gitta végezték.

5.6. Az inhibitorok koncentrációjának meghatározása

5.6.1. Szarvasmarha tripszin aktív koncentrációjának meghatározása

Szarvasmarha tripszint (Sigma-Aldrich T1426) oldottam be 1 mM HCl, 10 mM $CaCl_2$ -ban, alikvotoltam és folyékony nitrogénben fagyasztottam. A csöveket -80 °C-on tároltam.

A tripszin koncentrációját MUGB (4-metilumbelliferil 4-guanidinobenzoát) „öngyilkos” szubsztrát alkalmazásával határoztam meg (162). A tripszin és a MUGB 1:1 arányban reagál, ami során MUB (4-metilumbelliferon) fluorofór szabadul fel. A MUGB maradéka stabil kovalens acilenzim komplexet képez az enzimmal, ezáltal inaktíválva azt. A kísérleteket 96 mintahelyes fekete mikrotitráló lemezen végeztem 380 nm gerjesztési és 460 nm emissziós hullámhosszon, BioTek Synergy H4 lemezolvasó készülékkel. Kalibráló egyenest vettem fel ismert koncentrációjú

MUB oldat hígítási során. Ezután tripszin hígítási sorának tagjaihoz MUGB szubsztrátot adtam feleslegben és meghatároztam a minták fluoreszcencia intenzitását. Az aktív enzim koncentrációt a kapott fluoreszcencia intenzitás értékeknek a kalibráció során kapott értékekkel való összehasonlításával határoztam meg.

5.6.2. A TFPI1 D2 és a TFMI-2 variánsok koncentrációjának meghatározása

A TFPI1 D2 és a TFMI-2 variánsok a szarvasmarha tripszint nagy affinitással gátolják. Ezt kihasználva a koncentrációjukat ismert koncentrációjú tripszinnel szembeni titrálással határoztam meg. A mérések során 500 nM tripszin koncentrációt alkalmaztam. Az inhibitorok hígítási sorának tagjaihoz mértem az enzimet, majd 5 perc inkubálás után meghatároztam a maradék enzimaktivitást 2 mM N-benzoil-DL-arginin-4-nitroanilid (BAPNA) szubsztrát hozzáadását követően, 410 nm hullámhosszon végzett fotometriás kinetikai mérésben.

5.6.3. A TFMI-3 variánsok koncentrációjának meghatározása

A TFMI-3, TFMI-3_HA és TFMI-3_K135E_HA tripszinnel szembeni affinitása nem elég nagy ahhoz, hogy koncentrációjukat tripszinnel szembeni titrálással határozzam meg. Esetükben a szekvencia alapján becsült moláris extinkciós koefficienseket használtam (ExPasy ProtParam: <https://web.expasy.org/protparam>), és koncentrációjukat a 280 nm hullámhosszon mutatott fényelnyelésük alapján becsültem.

	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
TFMI-3	4845
TFMI-3_HA	9315
TFMI-3_K135E_HA	9315

5.7. Az inhibitorok egyensúlyi inhibíciós állandó (K_I) értékeinek meghatározása a MASP enzimekkel szemben.

A MASP enzimes méréseket a korábban közölt eljárás alapján (37) végeztem, módosításokkal. A TFPI1 D2, TFMI-2a-c és TFMI-3 inhibitorok MASP enzimekkel szembeni K_I értékeit 20 mM HEPES, 145 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,05% Triton X-100 pH 7,5 pufferben, 96 mintahelyes mikrotitráló lemezen mértem meg. Előkísérletekben meghatározott, adott koncentrációjú enzim oldatot kevertem az inhibitorok hígítási soraival, és az enzim:inhibitor mintákat szobahőmérsékleten inkubáltam két órán át. A mintákhoz 250 μM Z-L-Lys-SBzl szubsztrátot és 500 μM DTNB segédsubstrátot adtam és meghatároztam a maradék enzimaktivitást 410 nm

hullámhosszon, fotometriás kinetikai mérésben, BioTek Synergy H4 lemezleolvasó készüléken. A TFMI-3 MASP-3-mal szembeni K_I értékét megmértem Ca^{2+} -mentes pufferben (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0,05% Triton-X100 pH 7,4.) is.

Minden esetben meghatároztam a gátolatlan enzim aktivitását is, ezáltal a maradék enzimaktivitás adatokat a mintákban lévő szabad enzim koncentrációjának feleltethettem meg. Az adatokra a következő függvényt illesztettem az OriginPro szoftverben:

$$[E] = [E]_0 - \frac{[E]_0 + [I]_0 + K_I - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_I)^2 - 4[E]_0[I]_0}}{2},$$

ahol $[E]$ a szabad enzim moláris koncentrációja, $[E]_0$ az enzim bemérési moláris koncentrációja, $[I]$ az inhibitor moláris koncentrációja és K_I az egyensúlyi inhibíciós állandó.

Minden mérést többször elvégeztem, mérésenként legalább két független párhuzamossal. A párhuzamos mérések eredményeit külön-külön értékeltem ki és a K_I értékeket átlagoltam. Az értekezésben minden vizsgált enzim:inhibitor kölcsönhatás esetében egy reprezentatív kísérletben kapott K_I értéket mutatok be.

5.8. Felületi plazmon rezonancia (SPR) mérések

Az SPR kísérleteket BioRad ProteOn XPR36 készüléken végeztem. A HA epitóp címkét felismerő monoklonális ellenanyagot amino csoportokon keresztül, kovalensen rögzítettem GLM szenzor chip felszínére (Thermo Fisher Scientific, #26183). A felszínt 80 nM 1-etil-3-[3-dimetilamonopropil]-karbodiimid, 20 nM N-hidroxiszulfoszukcinimid oldattal aktiváltam (30 μL /perc, 5 perc), majd az ellenanyag 25 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációjú, 10 mM nátrium-acetát pH 4,5 pufferben hígított oldatát injektáltam (30 μL /perc, 5 perc). A felszínt 1 M etanolamin pH 8,5 oldattal (30 μL /perc, 5 perc) deaktiváltam. A kísérletek során használt puffer összetétele a következő volt: 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0,05% Triton X-100 pH 7,4. A Ca^{2+} -mentes kísérletek során a pufferben a CaCl_2 -ot 0,1 mM EDTA-val helyettesítettem.

A kísérletek során először TFMI-3_HA inhibitort injektáltam úgy, hogy 50-80 RU jelnövekedést kapjak. Ezt követően aktivált MASP-3cf 50 nM, 25 nM, 10 nM, 5 nM oldatát, valamint üres puffert injektáltam öt csatornán 25 μL /perc áramlási sebességgel. Az asszociációs fázis 420 másodpercig tartott, a disszociációt 600 másodpercig követtem. Az adatokra a készülék kiértékelő szoftverében globálisan illesztettem az 1:1 Langmuir kölcsönhatási modellt.

Zimogén MASP-3cf enzimmel is végeztem kísérleteket.

5.9. Normál emberi szérummal végzett komplement ELISA kísérletek

A kísérletek során használt NHS minták legalább tíz egészséges önkéntestől származtak. Az önkéntesektől vett vér szobahőmérsékleten inkubálva 1 óra alatt megalvadott. A csöveket ezt követően centrifugáltuk, és a felülúszókat (szérum) egyesítettük. A szérumot kis alikvotokban fagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk.

A szérum ELISA kísérletek eredményeit PerkinElmer EnSpire lemezleolvasó készülékkel rögzítettem. Az inhibitorokat az IC₅₀ érték megadásával jellemeztem, amit az OriginPro szoftverrel számítottam ki. A maradék komplement aktivitást ábrázoltam az inhibitor koncentrációjának logaritmus (log₁₀) függvényében, majd a dózis-hatás (DoseResp) függvényt illesztettem az adatsorokra. Minden esetben legalább két párhuzamos mérést végeztem.

5.9.1. Wieslab teszt

Az inhibitorok egyes komplement aktivációs útvonalakra gyakorolt hatásának híg szérumban történő vizsgálatára a Wieslab COMPL 300 (WiELISA) kitet (163) (Euro Diagnostica) használtam a gyártó leírása alapján, de kisebb módosításokkal (37). A kit alkalmazásával mindhárom útvonalat olyan körülmények között lehet mérni, ami mellett az adott útvonal működőképes, viszont a másik két útvonal inaktív. Mindhárom útvonalon történő mérés esetén a keletkezett C5b-9 terminális komplement antigén a detektált termék.

A szérumot a gyártó előírása szerint hígítottam az adott útvonal mérésére szolgáló pufferrel, 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd az inhibitorok hígítási soraival kevertem. A szérum:inhibitor mintákat 20 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd a speciális ELISA lemez megfelelő mintahelyeire mértem. Az előhívás lépéseit a gyártó előírása szerint végeztem.

5.9.2. C3 depozíció híg emberi szérumból.

Greiner high binding 96 mintahelyes ELISA lemez mintahelyeire 10 µg/mL koncentrációjú, 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃ pH 9,6 pufferben (burkoló puffer) oldott mannán oldatot mértem, majd a lemezt O/N 4 °C-on inkubáltam. Másnap a mintahelyeket 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 pH 7,4 pufferben oldott 1% BSA oldattal (TBS/BSA/T) blokkoltam legalább 1 órán keresztül, 37 °C-on. A lemezt 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% Tween-20 pH 7,4 (TBS/Ca/T) pufferrel mostam.

Az inhibitorokból hígítási sort készítettem szérumhígító pufferben (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20 pH 7,4), majd a mintákat 1:1 arányban

kevertem 50X hígított szérummal. Az így kapott, inhibitort tartalmazó 100X híg szérum mintákat 30 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd az előkészített mintahelyekre mértem az elegyeket és 30 percig 37 °C-on inkubáltam a lemezt. Újabb mosás (TBS/Ca/T) után 1% BSA-t is tartalmazó TBS/Ca/T (TBS/BSA/Ca/T) pufferben 2000X hígított poliklonális nyúl anti-humán C3c ellenanyagot (A0062, DakoCytomation) vittem a mintahelyekre. Az ellenanyagot 1 órán keresztül, 37 °C-on inkubáltam a lemezen, amit mosás (TBS/Ca/T) követett. TBS/BSA/Ca/T pufferben 40 000X hígított HRP-konjugált monoklonális egér anti-nyúl ellenanyagot (Sigma-Aldrich A1949) mértem a mintahelyekre és a lemezt 30 percig inkubáltam 37 °C-on. Az előhívás előtt mostam a lemezt (TBS/Ca/T), majd 50 mM citromsav pH 5,0 pufferben oldott 1 mg/mL o-fenilén-diamin szubsztrátot mértem a mintahelyekre. A szubsztrát oldathoz közvetlenül a felhasználás előtt 0.1%-ban adott 30% (w/w) H₂O₂ oldatot adtam. Az enzimreakciót 3-5 perc után 1 M kénsav hozzáadásával leállítottam, és a lemezt 490 nm hullámhosszon beolvastam.

5.9.3. C4 depozíció híg szérumból mannánnal, illetve AcBSA-val borított felszínen

A kísérletek a 5.9.2. fejezetben leírtakkal azonos módon zajlottak, a következő eltérésekkel:

- A mintahelyeket burkoló pufferben oldott 10 µg/mL mannánnal vagy 50 µg/mL AcBSA-val vontam be.
- A szérum végső hígítása 60X volt.
- A felszínre rakódott C4 fragmentumok mennyiségét detektáltam, amihez poliklonális nyúl anti-humán C4c elsődleges ellenanyagot (Q0369, DakoCytomation) használtam. Az ellenanyagot TBS/BSA/Ca/T pufferben hígítottam 2000X a mannános felszínen végzett, és 1000X az AcBSA felszínen végzett kísérletekhez.

Az AcBSA-t Hein és munkatársai leírása alapján készítettem (149). Az AcBSA koncentrációját a 280 nm hullámhosszon mutatott fényelnyelése alapján határoztam meg, amihez az $\epsilon_{280\text{ nm}} = 43,824\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ moláris extinkciós koefficienszt használtam.

5.9.4. C4 depozíció előaktivált MBL:MASP komplexekkel

A kísérleteket Petersen és munkatársai (147) és Kocsis és munkatársai (37) alapján kiviteleztem.

Greiner high binding ELISA lemez mintahelyeire burkoló pufferben oldott 1 mg/mL mannán oldatot mértem, majd a lemezt O/N 4 °C-on inkubáltam. A mintahelyeket blokkoltam 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Tween-20 pH 7,4 pufferrel (blokkoló puffer)

30 percig szobahőmérsékleten. A lemezt mostam 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% Tween-20 pH 7,4 pufferrel (mosó puffer).

A szérumot 1:1 arányban kevertem 40 mM HEPES, 2 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.1% Tween-20 pH 7,4 pufferrel, és az így kapott nagy ionerősségű 2X hígított szérum oldatot a mintahelyekre mértem. A lemezt 1 órán át inkubáltam 37 °C-on. A lemezt először nagy ionerősségű pufferrel (20 mM HEPES, 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% Tween-20 pH 7,4), majd mosó pufferrel mostam. Az inhibitorokból hígítási sort készítettem szérumhígító pufferben, ami 1 µg/mL C4 α-láncot is tartalmazott, majd a lemezre mértem a mintákat. Egy óra 37 °C-on történő inkubálás után a lemezt blokkoló pufferrel mostam és blokkoló pufferrel 1000X hígított poliklonális nyúl anti-humán C4c elsődleges ellenanyagot mértem a mintahelyekre, amit újabb 1 órás inkubálás követett 37 °C-on. A lemezt blokkoló pufferrel mostam, majd blokkoló pufferben 40 000X hígított HRP-konjugált monoklonális egér anti-nyúl ellenanyagot vittem a lemezre, amit 30 percig inkubáltam 37 °C-on. A lemezt mosó pufferrel mostam, majd 50 mM citrát pH 5,0 pufferben oldott 1 mg/mL o-feniléndiamin szubsztrátot mértem a mintahelyekre. A szubsztrát oldathoz közvetlenül a felhasználás előtt 0.1%-ban adott 30% (w/w) H₂O₂ oldatot adtam. Az enzimreakciót 3-5 perc után 1 M kénsav hozzáadásával leállítottam, és a lemezt 490 nm-en beolvastam.

5.9.5. Útvonal-szelektív komplement ELISA 2X híg szérummal

A kísérleteket Héja és munkatársai (56) alapján végeztem.

Lektin út

Greiner high binding ELISA lemez mintahelyeire burkoló pufferben oldott 10 µg/mL mannán oldatot mértem, majd a lemezt O/N 4 °C-on inkubáltam. Másnap a mintahelyeket TBS/BSA/T oldattal blokkoltam legalább 1 órán keresztül, 37 °C-on. A lemezt TBS/Ca/T pufferrel mostam. A szérumot 1:1 arányban kevertem az inhibitorok 2X koncentrált szérumhígító pufferben elkészített hígítási soraival. A minták 100 µg/mL végkoncentrációban SPS-t tartalmaztak a klasszikus út és az alternatív út aktiválódásának megakadályozására (149, 150). A mintákat 30 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd az előkészített mintahelyekre mértem azokat, és 30 percig 37 °C-on inkubáltam a lemezt.

A felszínre lerakódott C4 fragmentumok mennyiségét mértem a 5.9.3. alfejezetben leírtak szerint. Az elsődleges ellenanyagot 5000X hígításban alkalmaztam.

Klasszikus út

A kísérleteket a lektin út szelektív mérésekkel azonos módon végeztem el, a következő módosításokkal:

- A mintahelyeken 10 µg/mL, burkoló pufferben oldott emberi IgG-t immobilizáltam.
- A minták nem tartalmaztak SPS-t.

Alternatív út

A kísérleteket a lektin út szelektív mérésekkel azonos módon végeztem el, a következő módosításokkal:

- A mintahelyekre 10 µg/mL, burkoló pufferben oldott *Salmonella* lipopoliszacharidot mértem.
- A széruminhibitor mintákat CaCl₂-mentes, 10 mM EGTA-t tartalmazó szérumhígító pufferben készítettem el.
- A minták nem tartalmaztak SPS-t.
- A felszínre lerakódott C3 fragmentumok mennyiségét mértem a 5.9.2. alfejezetben leírtak szerint. Az elsődleges ellenanyagot 5000X hígításban alkalmaztam.

5.10. Patkány szérummal végzett komplement ELISA kísérletek

Ezeket a kísérleteket Kocsis Andrea végezte az MTA Enzimológiai Intézetben, Gál Péter kutatócsoportjában Wistar patkányok egyedi (nem-egyesített) szérumával.

5.10.1. C3 depozíció híg patkány szérumból.

A kísérletek mannánnal burkolt lemezekon zajlottak a 5.9.2. fejezetben leírtak szerint. A szérum hígítása 70X volt. A poliklonális nyúl anti-humán C3c ellenanyag felismeri a patkány C3 fragmentumokat. Az elsődleges ellenanyag hígítása 2000X volt.

5.10.2. C4 depozíció híg patkány szérumból.

A kísérletek mannánnal burkolt lemezekon zajlottak az 5.9.2. és 5.9.3. fejezetekben leírtak szerint. A szérum hígítása 60X volt. A poliklonális nyúl anti-humán C4c ellenanyag felismeri a patkány C3 fragmentumokat. Az elsődleges ellenanyag hígítása 2000X volt.

5.10.3. C5b-9 depozíció híg patkány szérumból.

A kísérletek mannánnal burkolt lemezekben zajlottak a 5.9.2. fejezetben leírtak szerint. A szérum hígítása 50X volt. Elsődleges ellenanyagként monoklonális egér anti-patkány C5b-9 ellenanyag (sc-66190, Santa Cruz) szolgált 1000X hígításban. Másodlagos ellenanyagként Andrea HRP-konjugált anti-egér ellenanyagot (AP308P, Merck) használt 3000X hígításban.

5.11. Véralvadási kísérletek

A kísérleteket Szász Róbert és Pál Gábor végezték.

Egy egészséges önkéntestől vett vénás vért kezeltek 3,8% w/v nátrium-citráttal. A mintát centrifugálták és a plazmát izolálták. A plazmával három, a klinikumban rutinszerűen alkalmazott tesztet: aktivált parciális tromboplastin idő (APTI), protrombin idő (PI) és trombin idő (TI) végeztek el Sysmex CA-1500 készüléken, Innovin reagenssel (Dale Behring).

5.12. TFMI-3 plazma pull-down, tömegspektrometria és adatelemzés

A kísérleteket Körtvély Előd végezte a Tübingeni Egyetemen az általam előállított rekombináns inhibitor fehérjékkel.

A kísérletekhez Előd egy egészséges önkéntestől származó, hirudint tartalmazó csövekbe vett vérből izolált plazmát, illetve citráttal kezelt, több donortól származó kevert plazmát használt. A kétféle plazma készítménnyel elvégzett kísérletek azonos eredményre vezettek.

500 μ L Mg^{2+} -ot és Ca^{2+} -ot tartalmazó, 0,1% Tween-20 detergenssel kiegészített PBS pufferrel (PBST) 25X hígított plazmához 1,75 μ g TFMI-3_HA inhibitorot adott, majd a mintát 1 órán át szobahőmérsékleten inkubálta, folyamatos rázatás mellett. Az abszolút kontroll mintában nem volt inhibitor. A specifikus kontroll mintában a TFMI-3_HA inhibitor TFMI-3_K135E_HA inhibitorral volt helyettesítve.

50 μ L PBST-vel mosott, a HA epitóp címkét felismerő ellenanyaggal borított mágneses gyöngyöt (Pierce) inkubált a mintákkal 20 percig szobahőmérsékleten, majd a gyöngyöket 6x5 percig mosta 500-500 μ L PBST oldattal. A gyöngyökhöz 100 μ L 2 mg/mL HA peptid (Pierce) oldatot adott, 5 perc inkubálást követően a gyöngyöket izolálta, majd megismételte a kompetitív elúciót, ezúttal 90 perc inkubálással. Az elúciós lépések után kapott felülúszókat Vivaspin 10 kDa cut-off (Sartorius) töményítő cellákban töményítette, majd metanol/kloroform eljárással kicsapta.

A fehérjét feloldotta, tripszinnel emésztette, majd a mintákat LC-MS/MS módszerrel analizálta, amihez egy UltiMate 3000 RSLC nano HPLC rendszert (Dionex) használt nano-spray ionforrással felszerelt Orbitrap Fusion tömegspektrométerhez (Thermo Fisher Scientific) kapcsolva. A kiértékeléshez a Mascot programot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1) és az emberi fehérjékre szűrt Swiss-Prot adatbázist (rel. 2015/11/11) használta. Az adatbázist kiegészítette a *MASP1* és *MASP2* gének összes alternatív splicinggal keletkező termékével, köztük a MASP-3 fehérjével is. A kiértékelés során azokat a peptideket vette figyelembe, amelyek azonosítása 80%-nál nagyobb valószínűséggel történt a Peptide Prophet algoritmus szerint (164). Azokat a fehérjét tekintette azonosítottnak, amelyekhez legalább 2 azonosított peptid tartozott, és amelyek esetében a valós pozitív találat valószínűsége legalább 95% volt (165).

5.13. Fluoreszcensen jelölt pro-FD hasadásának követése különböző plazma és szérum mintákban

A tesztet Oroszlán Gábor fejlesztette Dobó József vezetésével, az MTA Enzimológiai Intézetben, Gál Péter kutatócsoportjában. A kísérleteket Oroszlán Gábor végezte el az általam előállított inhibitor fehérjével. A kísérletekhez használt plazma és szérum minták 10 egészséges önkéntestől származtak. Az önkéntesektől vénás vért vettek Na₃-citrátot, K₃-EDTA-t, illetve rekombináns hirudint tartalmazó csövekbe (S-Monovette, Sarstedt) a plazma minták elkészítéséhez, illetve a véralvadást segítő (szilikát bevonatú műanyag gyöngyöket tartalmazó) csövekbe (S-Monovette, Sarstedt) a szérum minta elkészítéséhez. Az azonosan kezelt szérum, illetve plazma minták egyesítést és alikvotolást követően -80 °C-on voltak tárolva.

A kísérletek során Oroszlán Gábor lassan kiolvasztott 50 µL plazma vagy szérum mintát, amihez TFMI-3 inhibitor adott 100 nM vagy 1 µM végkoncentrációban úgy, hogy a hozzáadott inhibitor oldat térfogata ne haladja meg az 1 µL-t, ezzel minimalizálva a hígulás mértékét. A kontroll minták nem tartalmaztak inhibitor. A mintákat 10 perc szobahőmérsékleten való inkubálás után kiegészítette 5 µL Cy3-jelölt zimogén D-faktorról (kb. 3,5 µM végkoncentráció) (134), majd a mintákat 24 órán keresztül 37 °C-on inkubálta. A jelölt zimogén D-faktor hozzáadásakor, majd az első nyolc órában óránként, végül 24 órával a kísérlet kezdete után mintát vett SDS-PAGE analízishez. A mintákat azonnal redukáló SDS-PAGE kezelő oldathoz adta és 1 percre 95 °C-on forralta. A mintákat 12.5%-os SDS-PAGE géleken futtatta és Typhoon (GE Healthcare) lézer szkennelvel beolvasta. A géleket denzitometriás módszerrel értékelte ki.

Összefoglalás

Doktori munkám során az emberi TFPI1 D2 doménből kiindulva irányított evolúcióval kifejlesztettem a MASP-2 inhibitorok harmadik generációját, a TFMI-2 variánsokat. Az inhibitorokat enzimgátlási mérésekben, komplement ELISA és véralvadási tesztekben jellemeztem. Az eredmények igazolták, hogy a kitűzött céloknak megfelelően sikerült létrehoznom az emberi MASP-2 eddig leírt leghatékonyabb monospecifikus inhibitorát, és az emberi és patkány MASP-2 enzimet egyaránt nagy affinitással gátló változatot is, amelyek nincsenek hatással a MASP-1 és MASP-3 aktivitására. A TFMI-2 variánsok útvonalszelektív komplement inhibitorok: kizárólag a lektin utat gátolják és hatékonyabbak az eddigi legjobb MASP-2 inhibitornál. Az inhibitorok képesek az előaktivált PRM:MASP komplexek általi C4 depozíció gátlására is, ami az akut IRI kezelésére való alkalmasság fontos feltétele lehet. Igazoltuk, hogy a TFMI-2b gátolja a patkány lektin utat is, vagyis alkalmas lehet a TFMI-2a helyettesítésére patkány kísérletekben. Kimutattuk, hogy a TFMI-2 variánsok nem gátolják a véralvadást. Ezek a gyógyszerfejlesztési szempontból ígéretes eredmények ELTE és MTA szolgálati találmányt eredményeztek, amelynek tulajdonosa az Evolveritas Biotechnológiai Kft.. A cég a találmány iparjogvédelmét elindította, és terápiás célú fejlesztést folytat.

Doktori munkám másik felében a világon elsőként sikerült kifejlesztenem nagy affinitású, monospecifikus kanonikus MASP-3 inhibitorot, ami plazmában kizárólag az aktivált MASP-3 enzimhez köt. A TFMI-3-nak elnevezett inhibitorral lehetőségem nyílt a MASP-3 fiziológiás szerepének közvetlen vizsgálatára. Emberi szérummal elvégzett útvonalszelektív kísérletekben igazoltam, hogy a MASP-3 nem járul hozzá egyik komplement aktivációs útvonal működéséhez sem, és nem vesz részt a komplement aktivitás negatív szabályozásában. A TFMI-3 maradéktalanul gátolta a zimogén D-faktor aktiválódását plazmában, és nagymértékben lassította a folyamatot szérumban. Ez egyértelműen bizonyítja, hogy nyugvó emberi vérben a MASP-3 a D-faktor egyedüli aktivátora. Eredményeink azt mutatják, hogy a MASP-3 egy egyelőre azonosítatlan mechanizmusnak köszönhetően nagyrészt aktivált formában kering, és a vérbe jutó zimogén D-faktor aktiválásával folyamatosan biztosítja az alternatív út működőképességét. A szérumban és különböző plazma mintákban kapott eredmények eltérései arra utalnak, hogy az alvadási és gyulladásos folyamatok bizonyos enzimei képesek a MASP-3 aktiválására és ezáltal a D-faktor aktiválás ütemének gyorsítására, valamint hogy a trombin képes lehet a D-faktor közvetlen aktiválására szérumban.

Summary

In my PhD research, I developed the third generation of canonical MASP-2 inhibitors from TFPI1 D2 *via* phage display. I characterized the resulting TFMI-2 inhibitors in equilibrium enzyme inhibition measurements, complement ELISA and blood coagulation tests. The results of these assays demonstrated that I have successfully developed the hitherto most effective monospecific human MASP-2 inhibitor and also created a variant that has similarly high affinity for both human and rat MASP-2. I showed that these variants do not inhibit MASP-1 and MASP-3. The TFMI-2 variants exclusively inhibit the complement lectin pathway and are more effective than SGMI-2, the former strongest MASP-2 inhibitor. The variants inhibit C4 deposition driven by pre-activated PRM:MASP-2 complexes, which might be an indispensable capacity for a drug compound to effectively treat acute IRI. We confirmed that TFMI-2b inhibits the lectin pathway in rat serum, which makes this variant a promising surrogate molecule of TFMI-2a in experiments with rats. We also showed that the TFMI-2 variants do not affect blood coagulation. These results lead to a joint service invention in both host institutions, Eötvös Loránd University and Hungarian Academy of Sciences. The IP rights are owned by Evolveritas Biotechnology Ltd that filed a patent application and conducts drug development studies based on these inhibitors.

In the second part of my PhD research I developed the first high-affinity and monospecific canonical MASP-3 inhibitor. The inhibitor, named TFMI-3, binds solely to active MASP-3 in human plasma. TFMI-3 opened the door for directly studying the physiological roles of MASP-3. In pathway selective experiments with human serum I verified that MASP-3 does not contribute to the activity of any of the complement pathways and it does not participate in the regulation of complement activity. On the other hand, TFMI-3 completely inhibited the activation of zymogen factor D in plasma and substantially slowed the process in serum. This unequivocally proves that MASP-3 is the exclusive activator of factor D in resting human blood demonstrating that the lectin and the alternative pathways are fundamentally linked. The results also show that the MASP-3 pool is in large part activated in resting blood due to an unknown mechanism. By activating zymogen factor D MASP-3 ensures that the alternative pathway remains constantly functional. The differences of the results obtained in serum and plasma samples suggest that certain enzymes involved in blood coagulation and inflammatory processes are able to activate the residual zymogen MASP-3 pool and this way accelerate the activation of factor D. Moreover, thrombin might be able to directly activate factor D in human serum.

Irodalomjegyzék

1. Page, M. J., and Di Cera, E. (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **65**, 1220–1236
2. Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., and Finn, R. D. (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632
3. Barrett, A. J., Tolle, D. P., and Rawlings, N. D. (2003) Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem.* **384**, 873–882
4. Schechter, I., and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162
5. Kidmose, R. T., Laursen, N. S., Dobó, J., Kjaer, T. R., Sirotkina, S., Yatime, L., Sottrup-Jensen, L., Thiel, S., Gál, P., and Andersen, G. R. (2012) Structural basis for activation of the complement system by component C4 cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 15425–15430
6. Carugati, A., Pappalardo, E., Zingale, L. C., and Cicardi, M. (2001) C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol. Immunol.* **38**, 161–173
7. Heutink, K. M., ten Berge, I. J. M., Hack, C. E., Hamann, J., and Rowshani, A. T. (2010) Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol. Immunol.* **47**, 1943–1955
8. Lerch, M. M., and Gorelick, F. S. (2000) Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. *Med. Clin. North Am.* **84**, 549–563, viii
9. Stroud, R. M., Kossiakoff, A. A., and Chambers, J. L. (1977) Mechanisms of zymogen activation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 177–193
10. Ambrus, G., Gál, P., Kojima, M., Szilágyi, K., Balczer, J., Antal, J., Gráf, L., Laich, A., Moffatt, B. E., Schwaeble, W., Sim, R. B., and Závodszky, P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *J. Immunol.* **170**, 1374–1382
11. Harmat, V., Gál, P., Kardos, J., Szilágyi, K., Ambrus, G., Végh, B., Náray-Szabó, G., and Závodszky, P. (2004) The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J. Mol. Biol.* **342**, 1533–1546
12. Gál, P., Harmat, V., Kocsis, A., Bián, T., Barna, L., Ambrus, G., Végh, B., Balczer, J., Sim, R. B., Náray-Szabó, G., and Závodszky, P. (2005) A True Autoactivating Enzyme Structural Insight into Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease 2 Activations. *J. Biol. Chem.* **280**, 33435–33444
13. Ivanov, I., Matafonov, A., Sun, M.-F., Cheng, Q., Dickeson, S. K., Verhamme, I. M., Emsley, J., and Gailani, D. (2017) Proteolytic properties of single-chain factor XII: a mechanism for triggering contact activation. *Blood.* **129**, 1527–1537
14. Gál, P., Barna, L., Kocsis, A., and Závodszky, P. (2007) Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology.* **212**, 267–277
15. Forneris, F., Wu, J., and Gros, P. (2012) The modular serine proteases of the complement cascade. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 333–341
16. Bode, W., and Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433–451

17. Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., and Otlewski, J. (2003) Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **60**, 2427–2444
18. Rawlings, N. D., Tolle, D. P., and Barrett, A. J. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705–716
19. Finkenzstadt, W. R., and Laskowski, M. (1967) Resynthesis by trypsin of the cleaved peptide bond in modified soybean trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* **242**, 771–773
20. Shaw, G. L., Davis, B., Keeler, J., and Fersht, A. R. (1995) Backbone dynamics of chymotrypsin inhibitor 2: effect of breaking the active site bond and its implications for the mechanism of inhibition of serine proteases. *Biochemistry.* **34**, 2225–2233
21. Laskowski, M., Jr, and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593–626
22. Fischer, E. (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **27**, 2985–2993
23. Héja, D., Harmat, V., Fodor, K., Wilmanns, M., Dobó, J., Kékesi, K. A., Závodszy, P., Gál, P., and Pál, G. (2012) Monospecific inhibitors show that both mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) and -2 Are essential for lectin pathway activation and reveal structural plasticity of MASP-2. *J. Biol. Chem.* **287**, 20290–20300
24. Gombos, L., Kardos, J., Patthy, A., Medveczky, P., Szilágyi, L., Málnási-Csizmadia, A., and Gráf, L. (2008) Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges. *Biochemistry.* **47**, 1675–1684
25. Gohara, D. W., and Di Cera, E. (2011) Allosterity in trypsin-like proteases suggests new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol.* **29**, 577–585
26. Gáspári, Z., Várnai, P., Szappanos, B., and Perczel, A. (2010) Reconciling the lock-and-key and dynamic views of canonical serine protease inhibitor action. *FEBS Lett.* **584**, 203–206
27. Pozzi, N., Vogt, A. D., Gohara, D. W., and Di Cera, E. (2012) Conformational selection in trypsin-like proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 421–431
28. Taylor, F. R., Bixler, S. A., Budman, J. I., Wen, D., Karpusas, M., Ryan, S. T., Jaworski, G. J., Safari-Fard, A., Pollard, S., and Whitty, A. (1999) Induced fit activation mechanism of the exceptionally specific serine protease, complement factor D. *Biochemistry.* **38**, 2849–2859
29. Qasim, M. A., Ganz, P. J., Saunders, C. W., Bateman, K. S., James, M. N., and Laskowski, M., Jr (1997) Interscaffolding additivity. Association of P1 variants of eglin c and of turkey ovomucoid third domain with serine proteinases. *Biochemistry.* **36**, 1598–1607
30. Kelly, C. A., Laskowski, M., Jr, and Qasim, M. A. (2005) The role of scaffolding in standard mechanism serine proteinase inhibitors. *Protein Pept. Lett.* **12**, 465–471
31. Empie, M. W., and Laskowski, M. (1982) Thermodynamics and kinetics of single residue replacements in avian ovomucoid third domains: effect on inhibitor interactions with serine proteinases. *Biochemistry.* **21**, 2274–2284
32. Bigler, T. L., Lu, W., Park, S. J., Tashiro, M., Wieczorek, M., Wynn, R., and Laskowski, M. (1993) Binding of amino acid side chains to preformed cavities: interaction of serine proteinases with turkey ovomucoid third domains with coded and noncoded P1 residues. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2**, 786–799
33. Lu, W., Apostol, I., Qasim, M. A., Warne, N., Wynn, R., Zhang, W. L., Anderson, S., Chiang, Y. W., Ogin, E., Rothberg, I., Ryan, K., and Laskowski, M. (1997) Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases. *J. Mol. Biol.* **266**, 441–461

34. Krowarsch, D., Dadlez, M., Buczek, O., Krokoszynska, I., Smalas, A. O., and Otlewski, J. (1999) Interscaffolding additivity: binding of P1 variants of bovine pancreatic trypsin inhibitor to four serine proteases. *J. Mol. Biol.* **289**, 175–186
35. Grzesiak, A., Helland, R., Smalås, A. O., Krowarsch, D., Dadlez, M., and Otlewski, J. (2000) Substitutions at the P(1) position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. *J. Mol. Biol.* **301**, 205–217
36. Szenthe, B., Patthy, A., Gáspári, Z., Kékesi, A. K., Gráf, L., and Pál, G. (2007) When the surface tells what lies beneath: combinatorial phage-display mutagenesis reveals complex networks of surface-core interactions in the pacifastin protease inhibitor family. *J. Mol. Biol.* **370**, 63–79
37. Kocsis, A., Kékesi, K. A., Szász, R., Végh, B. M., Balczer, J., Dobó, J., Závodszky, P., Gál, P., and Pál, G. (2010) Selective inhibition of the lectin pathway of complement with phage display selected peptides against mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 and -2: significant contribution of MASP-1 to lectin pathway activation. *J. Immunol.* **185**, 4169–4178
38. Boros, E., Sebák, F., Héja, D., Szakács, D., Zboray, K., Schlosser, G., Micsonai, A., Kardos, J., Bodor, A., and Pál, G. (2018) Directed Evolution of Canonical Loops and their Swapping between Unrelated Serine Proteinase Inhibitors Disprove the Interscaffolding Additivity Model. *J. Mol. Biol.* **431**, 557–575
39. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J. D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–797
40. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015) Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262
41. Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L. T. (2015) Complement System Part II - Role in Immunity. *Front. Immunol.* **6**, 257
42. Roumenina, L. T., Sène, D., Radanova, M., Blouin, J., Halbwachs-Mecarelli, L., Dragon-Durey, M.-A., Fridman, W. H., and Fremeaux-Bacchi, V. (2011) Functional Complement C1q Abnormality Leads to Impaired Immune Complexes and Apoptotic Cell Clearance. *J. Immunol.* **187**, 4369–4373
43. Presumey, J., Bialas, A. R., and Carroll, M. C. (2017) Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease. *Adv. Immunol.* **135**, 53–79
44. Nayak, A., Ferlunga, J., Tsolaki, A. G., and Kishore, U. (2010) The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q. *Immunol. Lett.* **131**, 139–150
45. Phillips, A. E., Toth, J., Dodds, A. W., Giriya, U. V., Furze, C. M., Pala, E., Sim, R. B., Reid, K. B. M., Schwaeble, W. J., Schmid, R., Keeble, A. H., and Wallis, R. (2009) Analogous interactions in initiating complexes of the classical and lectin pathways of complement. *J. Immunol.* **182**, 7708–7717
46. Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., and Yamashina, I. (1987) Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* **262**, 7451–7454
47. Degn, S. E., and Thiel, S. (2013) Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand. J. Immunol.* **78**, 181–193
48. Bajic, G., Degn, S. E., Thiel, S., and Andersen, G. R. (2015) Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J.* **34**, 2735–2757

49. Matsushita, M., and Fujita, T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* **176**, 1497–1502
50. Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C. M., Schwaeble, W., Laursen, S. B., Poulsen, K., Willis, A. C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K. B., and Jensenius, J. C. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. **386**, 506–510
51. Thiel, S., Jensen, L., Degn, S. E., Nielsen, H. J., Gál, P., Dobó, J., and Jensenius, J. C. (2012) Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 38–48
52. Megyeri, M., Harmat, V., Major, B., Végh, Á., Balczer, J., Héja, D., Szilágyi, K., Datz, D., Pál, G., Závodszy, P., Gál, P., and Dobó, J. (2013) Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. *J. Biol. Chem.* **288**, 8922–8934
53. Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N. M., Jensenius, J. C., and Arlaud, G. J. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **276**, 40880–40887
54. Moller-Kristensen, M., Thiel, S., Sjöholm, A. G., Matsushita, M., and Jensenius, J. C. (2007) Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int. Immunol.* **19**, 141–149
55. Takahashi, M., Iwaki, D., Kanno, K., Ishida, Y., Xiong, J., Matsushita, M., Endo, Y., Miura, S., Ishii, N., Sugamura, K., and Fujita, T. (2008) Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J. Immunol.* **180**, 6132–6138
56. Héja, D., Kocsis, A., Dobó, J., Szilágyi, K., Szász, R., Závodszy, P., Pál, G., and Gál, P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 10498–10503
57. Dahl, M. R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A. C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., and Jensenius, J. C. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*. **15**, 127–135
58. Sirmaci, A., Walsh, T., Akay, H., Spiliopoulos, M., Sakalar, Y. B., Hasanefendioğlu-Bayrak, A., Duman, D., Farooq, A., King, M.-C., and Tekin, M. (2010) MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 679–686
59. Rooryck, C., Diaz-Font, A., Osborn, D. P. S., Chabchoub, E., Hernandez-Hernandez, V., Shamseldin, H., Kenny, J., Waters, A., Jenkins, D., Kaissi, A. A., Leal, G. F., Dallapiccola, B., Carnevale, F., Bitner-Glindzicz, M., Lees, M., Hennekam, R., Stanier, P., Burns, A. J., Peeters, H., Alkuraya, F. S., and Beales, P. L. (2011) Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat. Genet.* **43**, 197–203
60. Yongging, T., Wilmann, P. G., Reeve, S. B., Coetzer, T. H., Smith, I., Whisstock, J. C., Pike, R. N., and Wijeyewickrema, L. C. (2013) The x-ray crystal structure of mannose-binding lectin-associated serine proteinase-3 reveals the structural basis for enzyme inactivity associated ... - PubMed - NCBI. *J. Biol. Chem.* **288**, 22399–22407

61. Pihl, R., Jensen, L., Hansen, A. G., Thøgersen, I. B., Andres, S., Dagnæs-Hansen, F., Oexle, K., Enghild, J. J., and Thiel, S. (2017) Analysis of Factor D Isoforms in Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale Patients Highlights the Role of MASP-3 as a Maturase in the Alternative Pathway of Complement. *J. Immunol.* **199**, 2158–2170
62. Stover, C. M., Thiel, S., Thelen, M., Lynch, N. J., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J. C., and Schwaebler, W. J. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J. Immunol.* **162**, 3481–3490
63. Degn, S. E., Hansen, A. G., Steffensen, R., Jacobsen, C., Jensenius, J. C., and Thiel, S. (2009) MASP44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J. Immunol.* **183**, 7371–7378
64. Lachmann, P. J. (2018) Looking back on the alternative complement pathway. *Immunobiology.* **223**, 519–523
65. Harrison, R. A. (2018) The properdin pathway: an “alternative activation pathway” or a “critical amplification loop” for C3 and C5 activation? *Semin. Immunopathol.* **40**, 15–35
66. Harboe, M., and Mollnes, T. E. (2008) The alternative complement pathway revisited. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 1074–1084
67. Kemper, C., Atkinson, J. P., and Hourcade, D. E. (2010) Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 131–155
68. Gál, P., Dobó, J., Závodszy, P., and Sim, R. B. M. (2009) Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol. Immunol.* **46**, 2745–2752
69. Lacroix, M. B., Aude, C. A., Arlaud, G. J., and Colomb, M. G. (1989) Isolation and functional characterization of the proenzyme form of the catalytic domains of human C1r. *Biochem. J.* **257**, 885–891
70. Dobó, J., Schroeder, V., Jenny, L., Cervenak, L., Závodszy, P., and Gál, P. (2014) Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. *Mol. Immunol.* **61**, 69–78
71. Volanakis, J. E., and Narayana, S. V. (1996) Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **5**, 553–564
72. Lesavre, P. H., and Müller-Eberhard, H. J. (1978) Mechanism of action of factor D of the alternative complement pathway. *J. Exp. Med.* **148**, 1498–1509
73. Petersen, B. H., Lee, T. J., Snyderman, R., and Brooks, G. F. (1979) Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae bacteremia associated with C6, C7, or C8 deficiency. *Ann. Intern. Med.* **90**, 917–920
74. Lambris, J. D., Ricklin, D., and Geisbrecht, B. V. (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 132–142
75. Zipfel, P. F., Hallström, T., and Riesbeck, K. (2013) Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes--tipping the balance. *Mol. Immunol.* **56**, 152–160
76. Ricklin, D., Reis, E. S., Mastellos, D. C., Gros, P., and Lambris, J. D. (2016) Complement component C3 - The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol. Rev.* **274**, 33–58
77. Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehewet, B., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001) C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface

- Calreticulin and Cd91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* **194**, 781–796
78. Vandivier, R. W., Ogden, C. A., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Brown, K. K., Botto, M., Walport, M. J., Fisher, J. H., Henson, P. M., and Greene, K. E. (2002) Role of Surfactant Proteins A, D, and C1q in the Clearance of Apoptotic Cells In Vivo and In Vitro: Calreticulin and CD91 as a Common Collectin Receptor Complex. *J. Immunol.* **169**, 3978–3986
 79. Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., and Mizuochi, T. (1996) A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* **271**, 2448–2454
 80. Taira, S., Kodama, N., Matsushita, M., and Fujita, T. (2000) Opsonic function and concentration of human serum ficolin/P35. *Fukushima J. Med. Sci.* **46**, 13–23
 81. Böttger, E. C., Metzger, S., Bitter-Suermann, D., Stevenson, G., Kleindienst, S., and Burger, R. (1986) Impaired humoral immune response in complement C3-deficient guinea pigs: absence of secondary antibody response. *Eur. J. Immunol.* **16**, 1231–1235
 82. O’Neil, K. M., Ochs, H. D., Heller, S. R., Cork, L. C., Morris, J. M., and Winkelstein, J. A. (1988) Role of C3 in humoral immunity. Defective antibody production in C3-deficient dogs. *J. Immunol.* **140**, 1939–1945
 83. Dempsey, P. W., Allison, M. E. D., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., and Fearon, D. T. (1996) C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* **271**, 348–350
 84. Mognini, P. K., Vilensky, M. A., Highet, P. F., and Inman, J. K. (1997) The affinity threshold for human B cell activation via the antigen receptor complex is reduced upon coligation of the antigen receptor with CD21. *J. Immunol.* **159**, 3782–3791
 85. Kerekes, K., Prechl, J., Bajtay, Z., Józsi, M., and Erdei, A. (1998) A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. *Int. Immunol.* **10**, 1923–1930
 86. Kerekes, K., Cooper, P. D., Prechl, J., Józsi, M., Bajtay, Z., and Erdei, A. (2001) Adjuvant effect of gamma-inulin is mediated by C3 fragments deposited on antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 69–74
 87. Zipfel, P. F., and Skerka, C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 729–740
 88. Dobó, J., Harmat, V., Beinrohr, L., Sebestyén, E., Závodszky, P., and Gál, P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J. Immunol.* **183**, 1207–1214
 89. Paréj, K., Dobó, J., Závodszky, P., and Gál, P. (2013) The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while α 2-macroglobulin is not. *Mol. Immunol.* **54**, 415–422
 90. Grumach, A. S., and Kirschfink, M. (2014) Are complement deficiencies really rare? Overview on prevalence, clinical importance and modern diagnostic approach. *Mol. Immunol.* **61**, 110–117
 91. Gulati, S., Agarwal, S., Vasudhev, S., Rice, P. A., and Ram, S. (2012) Properdin is critical for antibody-dependent bactericidal activity against *Neisseria gonorrhoeae* that recruit C4b-binding protein. *J. Immunol.* **188**, 3416–3425
 92. Macedo, A. C. L., and Isaac, L. (2016) Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. *Front. Immunol.* **7**, 55

93. Hill, A., DeZern, A. E., Kinoshita, T., and Brodsky, R. A. (2017) Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat. Rev. Dis. Primer.* **3**, 17028
94. Dobó, J., Kocsis, A., and Gál, P. (2018) Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases. *Front. Immunol.* **9**, 1851
95. Ricklin, D., Mastellos, D. C., Reis, E. S., and Lambris, J. D. (2018) The renaissance of complement therapeutics. *Nat. Rev. Nephrol.* **14**, 26–47
96. Berger, N., Alayi, T. D., Resuello, R. R. G., Tuplano, J. V., Reis, E. S., and Lambris, J. D. (2018) New Analogs of the Complement C3 Inhibitor Compstatin with Increased Solubility and Improved Pharmacokinetic Profile. *J. Med. Chem.* **61**, 6153–6162
97. Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., and Stevens, B. (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science.* **352**, 512–716
98. Tüzün, E., and Christadoss, P. (2013) Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 904–911
99. Hart, M. L., Ceonzo, K. A., Shaffer, L. A., Takahashi, K., Rother, R. P., Reenstra, W. R., Buras, J. A., and Stahl, G. L. (2005) Gastrointestinal Ischemia-Reperfusion Injury Is Lectin Complement Pathway Dependent without Involving C1q. *J. Immunol.* **174**, 6373–6380
100. Schwaeble, W. J., Lynch, N. J., Clark, J. E., Marber, M., Samani, N. J., Ali, Y. M., Dudler, T., Parent, B., Lhotta, K., Wallis, R., Farrar, C. A., Sacks, S., Lee, H., Zhang, M., Iwaki, D., Takahashi, M., Fujita, T., Tedford, C. E., and Stover, C. M. (2011) Targeting of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 confers protection from myocardial and gastrointestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 7523–7528
101. Asgari, E., Farrar, C. A., Lynch, N., Ali, Y. M., Roscher, S., Stover, C. M., Zhou, W., Schwaeble, W. J., and Sacks, S. H. (2014) Mannan-binding lectin-associated serine protease 2 is critical for the development of renal ischemia reperfusion injury and mediates tissue injury in the absence of complement C4. *FASEB J.* **28**, 3996–4003
102. Orsini, F., Chrysantou, E., Dudler, T., Cummings, J., Takahashi, M., Fujita, T., Demopoulos, G., De Simoni, M.-G., and Schwaeble, W. (2016) Mannan binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) critically contributes to post-ischemic brain injury independent of MASP-1. *J. Neuroinflammation.* **13**, 213
103. Tan, P. L., Bowes Rickman, C., and Katsanis, N. (2016) AMD and the alternative complement pathway: genetics and functional implications. *Hum. Genomics.* **10**, 23
104. Le Quinterec, M., Roumenia, L., Noris, M., and Fremeaux-Bacchi, V. (2010) Atypical hemolytic uremic syndrome associated with mutations in complement regulator genes. *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 641–652
105. Murray, C. W., and Rees, D. C. (2009) The rise of fragment-based drug discovery. *Nat. Chem.* **1**, 187–192
106. Maibaum, J., Liao, S.-M., Vulpetti, A., Ostermann, N., Randl, S., Rüdiger, S., Lorthiois, E., Erbel, P., Kinzel, B., Kolb, F. A., Barbieri, S., Wagner, J., Durand, C., Fetti, K., Dussauge, S., Hughes, N., Delgado, O., Hommel, U., Gould, T., Mac Sweeney, A., Gerhartz, B., Cumin, F., Flohr, S., Schubart, A., Jaffee, B., Harrison, R., Risitano, A. M., Eder, J., and Anderson, K. (2016) Small-molecule factor D inhibitors targeting the alternative complement pathway. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 1105–1110

107. Zuraw, B., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. (2010) Ecallantide. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 189–190
108. Lunn, M., and Banta, E. (2011) Ecallantide for the treatment of hereditary angiodema in adults. *Clin. Med. Insights Cardiol.* **5**, 49–54
109. Marvin, D. A. (1998) Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 150–158
110. Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* **228**, 1315–1317
111. Smith, G. P., and Petrenko, V. A. (1997) Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391–410
112. Pal, G., and Fellouse, F. (2005) Methods for the Construction of Phage-Displayed Libraries. in *Phage Display In Biotechnology and Drug Discovery*, pp. 111–142, Drug Discovery Series, CRC Press, 10.1201/9780849359125.ch3
113. Sidhu, S. S., Fairbrother, W. J., and Deshayes, K. (2003) Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **4**, 14–25
114. Sidhu, S. S., and Koide, S. (2007) Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 481–487
115. Zani, M.-L., and Moreau, T. (2010) Phage display as a powerful tool to engineer protease inhibitors. *Biochimie.* **92**, 1689–1704
116. Szabó, A., Héja, D., Szakács, D., Zboray, K., Kékesi, K. A., Radisky, E. S., Sahin-Tóth, M., and Pál, G. (2011) High-affinity small protein inhibitors of human chymotrypsin C (CTRC) selected by phage display reveal unusual preference for P4' acidic residues. *J. Biol. Chem.* **286**, 22535–22545
117. Degn, S. E., Jensen, L., Hansen, A. G., Duman, D., Tekin, M., Jensenius, J. C., and Thiel, S. (2012) Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 Is Crucial for Lectin Pathway Activation in Human Serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 Is Required for Alternative Pathway Function. *J. Immunol.* **189**, 3957–3969
118. Clark, J. E., Dudler, T., Marber, M. S., and Schwaeble, W. J. (2018) Cardioprotection by an anti-MASP-2 antibody in a murine model of myocardial infarction. *Open Heart.* **5**, e000652
119. Pavlov, V. I., Skjoedt, M.-O., Tan, Y. S., Rosjberg, A., Garred, P., and Stahl, G. L. (2012) Endogenous and natural complement inhibitor attenuates myocardial injury and arterial thrombogenesis. *Circulation.* **126**, 2227–2235
120. Pavlov, V. I., Tan, Y. S., McClure, E. E., La Bonte, L. R., Zou, C., Gorsuch, W. B., and Stahl, G. L. (2015) Human mannose-binding lectin inhibitor prevents myocardial injury and arterial thrombogenesis in a novel animal model. *Am. J. Pathol.* **185**, 347–355
121. Osthoff, M., Katan, M., Fluri, F., Schuetz, P., Bingisser, R., Kappos, L., Steck, A. J., Engelter, S. T., Mueller, B., Christ-Crain, M., and Trendelenburg, M. (2011) Mannose-binding lectin deficiency is associated with smaller infarction size and favorable outcome in ischemic stroke patients. *PloS One.* **6**, e21338
122. Schoos, M. M., Munthe-Fog, L., Skjoedt, M.-O., Ripa, R. S., Lønborg, J., Kastrup, J., Kelbæk, H., Clemmensen, P., and Garred, P. (2013) Association between lectin complement pathway initiators, C-reactive protein and left ventricular remodeling in myocardial infarction-a magnetic resonance study. *Mol. Immunol.* **54**, 408–414
123. Zhang, M., Hou, Y., Cavusoglu, E., Lee, D. C., Steffensen, R., Yang, L., Bashari, D., Villamil, J., Moussa, M., Fernaine, G., Jensenius, J. C., Marmur, J. D., Ko, W., and Shevde, K. (2013) MASP-2 Activation is Involved in Ischemia-related Necrotic Myocardial Injury in Humans. *Int. J. Cardiol.* **166**, 499–504

124. Panagiotou, A., Trendelenburg, M., and Osthoff, M. (2018) The Lectin Pathway of Complement in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury—Review of Its Significance and the Potential Impact of Therapeutic Interference by C1 Esterase Inhibitor. *Front. Immunol.* **9**, 1151
125. Megyeri, M., Makó, V., Beinrohr, L., Doleschall, Z., Prohászka, Z., Cervenak, L., Závodszy, P., and Gál, P. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J. Immunol.* **183**, 3409–3416
126. Dobó, J., Major, B., Kékesi, K. A., Szabó, I., Megyeri, M., Hajela, K., Juhász, G., Závodszy, P., and Gál, P. (2011) Cleavage of Kininogen and Subsequent Bradykinin Release by the Complement Component: Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1. *PLOS ONE*. **6**, e20036
127. Jenny, L., Dobó, J., Gál, P., Pál, G., Lam, W. A., and Schroeder, V. (2018) MASP-1 of the complement system enhances clot formation in a microvascular whole blood flow model. *PLOS ONE*. **13**, e0191292
128. Paréj, K., Andrea, K., Enyingi, C., Dani, R., Oroszlán, G., Beinrohr, L., Dobó, J., Závodszy, P., Pál, G., and Gál, P. (2018) Cutting Edge: A New Player in the Alternative Complement Pathway, MASP-1 Is Essential for LPS-Induced, but Not for Zymosan-Induced, Alternative Pathway Activation. *J. Immunol.* **200**, 2247–2252
129. Takahashi, M., Ishida, Y., Iwaki, D., Kanno, K., Suzuki, T., Endo, Y., Homma, Y., and Fujita, T. (2010) Essential role of mannose-binding lectin-associated serine protease-1 in activation of the complement factor D. *J. Exp. Med.* **207**, 29–37
130. Iwaki, D., Kanno, K., Takahashi, M., Endo, Y., Matsushita, M., and Fujita, T. (2011) The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J. Immunol.* **187**, 3751–3758
131. Ruseva, M. M., Takahashi, M., Fujita, T., and Pickering, M. C. (2014) C3 dysregulation due to factor H deficiency is mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASP)-1 and MASP-3 independent in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* **176**, 84–92
132. Degn, S. E., Jensenius, J. C., and Thiel, S. (2014) The Pro-Factor D Cleaving Activity of MASP-1/-3 Is Not Required for Alternative Pathway Function. *J. Immunol.* **192**, 5447–5448
133. Takahashi, M., Sekine, H., and Fujita, T. (2014) Comment on “The Pro-Factor D Cleaving Activity of MASP-1/-3 Is Not Required for Alternative Pathway Function.” *J. Immunol.* **192**, 5448–5449
134. Oroszlán, G., Kortvely, E., Szakács, D., Kocsis, A., Dammeier, S., Zeck, A., Ueffing, M., Závodszy, P., Pál, G., Gál, P., and Dobó, J. (2016) MASP-1 and MASP-2 Do Not Activate Pro-Factor D in Resting Human Blood, whereas MASP-3 Is a Potential Activator: Kinetic Analysis Involving Specific MASP-1 and MASP-2 Inhibitors. *J. Immunol.* **196**, 857–865
135. Girard, T. J., Warren, L. A., Novotny, W. F., Likert, K. M., Brown, S. G., Miletich, J. P., and Broze, G. J. (1989) Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature*. **338**, 518–520
136. Burgering, M. J., Orbons, L. P., van der Doelen, A., Mulders, J., Theunissen, H. J., Grootenhuys, P. D., Bode, W., Huber, R., and Stubbs, M. T. (1997) The second Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor: cloning, structure determination and interaction with factor Xa. *J. Mol. Biol.* **269**, 395–407

137. Wouters, D., Keizer, M., Hart, M., Pouw, R., Wolbink, A., Kuijpers, T., Hamann, D., and Aarden, L. (2011) The lectin pathway is inhibited by an anti-coagulant protease inhibitor acting on MASP-2. *Mol. Immunol.* **48**, 1687
138. Keizer, M. P., Pouw, R. B., Kamp, A. M., Patiwaal, S., Marsman, G., Hart, M. H., Zeerleder, S., Kuijpers, T. W., and Wouters, D. (2015) TFPI inhibits lectin pathway of complement activation by direct interaction with MASP-2. *Eur. J. Immunol.* **45**, 544–550
139. Novotny, W. F., Brown, S. G., Miletich, J. P., Rader, D. J., and Broze, G. J. (1991) Plasma antigen levels of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood.* **78**, 387–393
140. Chung, C. H., Ives, H. E., Almeda, S., and Goldberg, A. L. (1983) Purification from *Escherichia coli* of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J. Biol. Chem.* **258**, 11032–11038
141. Pál, G., Sprengel, G., Patthy, A., and Gráf, L. (1994) Alteration of the specificity of ecotin, an *E. coli* serine proteinase inhibitor, by site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **342**, 57–60
142. Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645
143. Weiss, G. A., Watanabe, C. K., Zhong, A., Goddard, A., and Sidhu, S. S. (2000) Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8950–8954
144. Pál, G., Kouadio, J.-L. K., Artis, D. R., Kossiakoff, A. A., and Sidhu, S. S. (2006) Comprehensive and quantitative mapping of energy landscapes for protein-protein interactions by rapid combinatorial scanning. *J. Biol. Chem.* **281**, 22378–22385
145. Bussiere, J. L. (2008) Species selection considerations for preclinical toxicology studies for biotherapeutics. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 871–877
146. Bussiere, J. L., Martin, P., Horner, M., Couch, J., Flaherty, M., Andrews, L., Beyer, J., and Horvath, C. (2009) Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals. *Int. J. Toxicol.* **28**, 230–253
147. Petersen, S. V., Thiel, S., Jensen, L., Steffensen, R., and Jensenius, J. C. (2001) An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J. Immunol. Methods.* **257**, 107–116
148. Presanis, J. S., Hajela, K., Ambrus, G., Gál, P., and Sim, R. B. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol. Immunol.* **40**, 921–929
149. Hein, E., Honoré, C., Skjoedt, M.-O., Munthe-Fog, L., Hummelshøj, T., and Garred, P. (2010) Functional analysis of Ficolin-3 mediated complement activation. *PloS One.* **5**, e15443
150. Palarasah, Y., Skjoedt, M.-O., Vitved, L., Andersen, T. E., Skjoedt, K., and Koch, C. (2010) Sodium polyanethole sulfonate as an inhibitor of activation of complement function in blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 908–914
151. Broze, G. J., Girard, T. J., and Novotny, W. F. (1990) Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry.* **29**, 7539–7546
152. Gaboriaud, C., Gupta, R. K., Martin, L., Lacroix, M., Serre, L., Teillet, F., Arlaud, G. J., Rossi, V., and Thielens, N. M. (2013) The Serine Protease Domain of MASP-3: Enzymatic Properties and Crystal Structure in Complex with Ecotin. *PLoS ONE.* 10.1371/journal.pone.0067962
153. Skjoedt, M.-O., Palarasah, Y., Munthe-Fog, L., Jie Ma, Y., Weiss, G., Skjodt, K., Koch, C., and Garred, P. (2010) MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum

- concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. *Immunobiology*. **215**, 921–931
154. Degn, S. E., Jensen, L., Gál, P., Dobó, J., Holmvaad, S. H., Jensenius, J. C., and Thiel, S. (2010) Biological variations of MASP-3 and MAP44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. *J. Immunol. Methods*. **361**, 37–50
 155. Banda, N. K., Acharya, S., Scheinman, R. I., Mehta, G., Coulombe, M., Takahashi, M., Sekine, H., Thiel, S., Fujita, T., and Holers, V. M. (2016) Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease 1/3 Cleavage of Pro-Factor D into Factor D In Vivo and Attenuation of Collagen Antibody-Induced Arthritis through Their Targeted Inhibition by RNA Interference-Mediated Gene Silencing. *J. Immunol.* **197**, 3680–3694
 156. Hayashi, M., Ishida, Y., Machida, T., Ogata, Y., Omori, T., Takasumi, M., Endo, Y., Ikawa, M., Ohira, H., Fujita, T., and Sekine, H. (2018) MASP-1 and MASP-3 play independent roles in activation of the lectin and alternative complement pathways. *Mol. Immunol.* **102**, 161
 157. Oroszlán, G., Dani, R., Szilágyi, A., Závodszy, P., Thiel, S., Gál, P., and Dobó, J. (2017) Extensive Basal Level Activation of Complement Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3: Kinetic Modeling of Lectin Pathway Activation Provides Possible Mechanism. *Front. Immunol.* **8**, 1821
 158. Sidhu, S. S., Lowman, H. B., Cunningham, B. C., and Wells, J. A. (2000) Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol.* **328**, 333–363
 159. Kunkel, T. A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 488–492
 160. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S. E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190
 161. Kiss, B., Duelli, A., Radnai, L., Kékesi, K. A., Katona, G., and Nyitray, L. (2012) Crystal structure of the S100A4-nonmuscle myosin IIA tail fragment complex reveals an asymmetric target binding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6048–6053
 162. Jameson, G. W., Roberts, D. V., Adams, R. W., Kyle, W. S. A., and Elmore, D. T. (1973) Determination of the operational molarity of solutions of bovine α -chymotrypsin, trypsin, thrombin and factor Xa by spectrofluorimetric titration. *Biochem. J.* **131**, 107–117
 163. Seelen, M. A., Roos, A., Wieslander, J., Mollnes, T. E., Sjöholm, A. G., Wurzner, R., Loos, M., Tedesco, F., Sim, R. B., Garred, P., Alexopoulos, E., Turner, M. W., and Daha, M. R. (2005) Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J. Immunol. Methods*. **296**, 187–198
 164. Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* **74**, 5383–5392
 165. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**, 4646–4658

Rövidítésjegyzék

AT – antitrombin

BSA – bovine serum albumin, szarvasmarha
szérumalbumin

AcBSA – acetilált BSA szérumalbumin

aHUS – atipikus hemolitikus urémiás
szindróma

AMD – age-related macular degeneration,
időskori makuladegeneráció

BAPNA – N-benzoil-DL-arginin-4-
nitroanilid

CCP – complement control protein,
komplement kontrol protein domén

CPN – karboxipeptidáz N

CUB – C1r/C1s, tengeri sün Uegf, Bone
morphogenetic protein-1 domén

C1-inh – C1-inhibitor

DTNB – 5,5'-ditiobisz-(2-nitrobenzoésav)

EGF – epidermal growth factor, epidermális
növekedési faktor domén

ELISA – enzyme-linked immunosorbent
assay, enzimhez kötött
immunoszorbens teszt

ESI-MS – electrospray ionization mass
spectrometry, elektropray
ionizációs tömegspektroszkópia

GPI – glikozil-foszfatidil-inozitol

HA címke – hemagglutinin epitóp címke

HRP – horseradish peroxidase,
torma-peroxidáz

IMAC – immobilized metal affinity
chromatography, immobilizált
fémion affinitás kromatográfia

IC₅₀ – half maximal inhibitory
concentration, a kísérletben kapott
maximális jel felére csökkentéséhez
szükséges inhibitor koncentráció

IRI – ischaemia reperfusion injury,
iszkémiás-reperfúziós szövetkárosodás

K_D – egyensúlyi disszociációs állandó

K_I – egyensúlyi inhibíciós állandó

LC-MS/MS – liquid chromatography
tandem mass spectroscopy,
folyadékkromatográfia
kapcsolt tandem
tömegspektrometria

MAC – membrane attack complex,
membránkárosító komplex

MBL – mannan-binding lectin, mannózkötő
lektin

MASP – MBL-associated serine protease,
MBL-hez kapcsolt szerin proteáz

MUB – 4-metilumbelliferon

MUGB – 4-metilumbelliferil-4-
guanidinbenzoát

NHS – normal human serum, normál emberi
szérum

PBS – phosphate buffered saline, foszfát
pufferes sóoldat

PEG – polietilén-glikol

PRM – pattern recognition molecule,
mintázatfelismerő molekula

RP-HPLC – reversed-phase high-
performance liquid
chromatography, fordított
fázisú nagy teljesítményű
folyadékkromatográfia

SFTI – sunflower trypsin inhibitor,
napraforgó tripszin inhibitor

SFMI-1 – SFTI-based MASP-1 inhibitor

SFMI-2 – SFTI-based MASP-2 inhibitor

SGPI-2 – *Schistocerca gregaria* protease
inhibitor 2

SGMI-1 – SGPI-2-based MASP-1 inhibitor

SGMI-2 – SGPI-2-based MASP-2 inhibitor

SP domén – szerin proteáz domén

SPR – surface plasmon resonance, felületi
plazmon rezonancia

SPS – sodium polyanethol sulfonate,
nátrium polianetol-szulfonát

TEV proteáz – Tobacco etch virus, dohány
karcolatos vírus proteáz

TFPI1 – tissue factor pathway inhibitor,
szöveti faktor útvonal inhibitor

TFPI1 D1 – TFPI1 első Kunitz domén

TFPI1 D2 – TFPI1 második Kunitz domén

TFMI-2 – TFPI1 D2-based MASP-2
inhibitor

TFMI-3 – TFPI1 D2-based MASP-3
inhibitor

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

Z-L-Lys-SBzl – N- α -karboxibenzil-L-lizin-
tiobenzil-észter

3MC szindróma – Mignarelli, Malpuech,
Michels, Carnevale
szindróma

Függelék

F1. Ábra

pTac promóter

GTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG

pTac promóter

MaleE szignál

CCAGTCCGTTTAGGTGTTTTACGAGCACTTCACCAACAAGGACCATAG**CAT** **ATG**AAAATAAAACAGGT

M K I K T G

MaleE szignál

FLAG címke

GCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAAACGACGATGATGTTTTCCGCCTCGGC**GCTAGCATCG** GATTATA

A R I L A L S A L T T M M F S A S A L A S D Y K

FLAG címke

Ser/Gly linker

TFPII D2

AAGACGATGATGACAAA **GCTTCCGGCGGGTCCGGAGGCTCGGGC** AAACCGGACTTCTGCTTCCTGGAAG

D D D D K A S G G S G G S G K P D F C F L E E

TFPII D2

AAGACCCGGGTATCTGCGGTGGTTACATCACCGTTACTTCTACAACAACCAGACCAAACAGTGCGAACGT

D P G I C R G Y I T R Y F Y N N Q T K Q C E R

P3 P1 P1' P2' P3' P4'

TFPII D2

TTCAAATACGGTGGTTGCCTGGGTAACATGAACAACCTTCGAAACCCTGGAAGAATGCAAAAACATCTGCGA

F K Y G G C L G N M N N F E T L E E C K N I C E

TFPII D2

Ser/Gly linker

p8 burokfehérje

AGACGGT GGCGGCAGCGGCGGCAGCGGCGG**GAGCTCCAGC** GCCGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGC

D G G G S G G S G G S S S A E G D D P A K A A

p8 burokfehérje

CTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTGCG

F N S L Q A S A T E Y I G Y A W A M V V V I V G

p8 burokfehérje

GCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTACCTCGAAAGCAAGCTAAT**CTAGA**

A T I G I K L F K K F T S K A S *

F1. Ábra - A TFPII D2 – p8 fúziós konstrukció DNS és fehérje szekvenciája

A konstrukció moduláris módosítását lehetővé tevő restriktációs endonukleáz hasítóhelyeket félkövér betűkkel jelöltem. A különböző funkcionális modulokat az azokat kódoló DNS szekvencia aláhúzásával jelöltem és a szekvencia fölött megneveztem. A fágbemutató során evolált P3-P4' régiót szürke kiemeléssel láttam el. A P2 cisztein a proteázkötő hurok kanonikus szerkezetének kialakításához elengedhetetlen diszulfid hidat képez, ezért ezt nem módosítottam a munka során.

F2. Ábra

His ₆ -címke										S100A4											
CCATGGGC	CATCACC	ATCACC	CATCAC	GCTAGC	ATGGCGT	CCCCCT	CTGGAGA	AAGGCC	CTGGAT	GTGATG											
M	G	H	H	H	H	H	H	A	S	M	A	S	P	L	E	K	A	L	D	V	M

S100A4																							
GTGTCC	ACCTT	CCACA	AGTACT	CGGGC	AAAGAG	GGTGACA	AGTTCA	AGCTCA	ACAAGT	CAGAACT	AAGGA												
V	S	T	F	H	K	Y	S	G	K	E	G	D	K	F	K	L	N	K	S	E	L	K	E

S100A4																							
GCTGCT	GACCC	GGGAG	CTGCC	CAGCTT	CTTGGG	GAAAAG	GACAGAT	GAAGCT	GCTTT	CCAGA	AGCTG	ATGA											
L	L	T	R	E	L	P	S	F	L	G	K	R	T	D	E	A	A	F	Q	K	L	M	S

S100A4																						
GCAACT	TGGAC	AGCAAC	AGGGACA	ACGAGG	TGGACT	TCCAAG	AGTACT	GTGTCT	TCTC	TGTCCT	CCATCGC											
N	L	D	S	N	R	D	N	E	V	D	F	Q	E	Y	C	V	F	L	S	S	I	A

S100A4															TEV hely							
CATGAT	GTCTA	ACGAAT	TCTTT	GAAGG	CTTCC	CAGATA	AAGCAG	CCCAGG	AAGAAA	GTCGAC	GACTAC	GGA										
M	M	S	N	E	F	F	E	G	F	P	D	K	Q	P	R	K	K	V	D	D	Y	D

TEV proteáz hasítóhely										TFPI1 D2												
CATCCC	GA	CTAC	CGAAA	ACCTGT	ACTTCC	AG GGATCC	AAAC	CGGACT	TCTGCT	TCCTG	GAA	GAAG	ACCCG									
I	P	T	T	E	N	L	Y	F	Q	G	S	K	P	D	F	C	F	L	E	E	D	P

TFPI1 D2																							
GGTATCT	GC	CGTGG	TTACAT	CACCC	CGTTACT	TCTACA	ACAACC	AGACCA	AAACAG	TGCGA	ACGTTT	CAAATA											
G	I	C	R	G	Y	I	T	R	Y	F	Y	N	N	Q	T	K	Q	C	E	R	F	K	Y
	P3		P1	P1'	P2'	P3'	P4'																

TFPI1 D2																							
CGGTGG	TTGCCT	TGGGTA	ACATGA	ACAAC	TTCGAA	ACCCTG	GGAAGA	TGCAAAA	ACATCT	GCGAAG	ACGGTT												
G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	L	E	E	C	K	N	I	C	E	D	G	*

AATA**AAGCTT**GGCACT**CGAG**

F2. Ábra - S100A4 – TFPI1 D2 fúziós konstrukció ábra

A konstrukció moduláris módosítását lehetővé tevő restriktációs endonukleáz hasítóhelyeket félkövér betűkkel jelöltem. A különböző funkcionális modulokat az azokat kódoló DNS szekvencia aláhúzásával jelöltem és a szekvencia fölött megneveztem. A fágbemutató során evolváló P3-P4' régiót, ahol az egyes inhibitorok különbségeket hordoznak, szürke kiemeléssel láttam el.

F3. Ábra

MRWLLLYAL	CFSLSKASAH	TVELNNMFGQ	IQSPGYPDSY	PSDSEVTWNI
TVPDGFRIKL	YFMHFNLESS	YLCEYDYVKV	ETEDQVLATF	CGRETTDTEQ
TPGQEVVLSP	GSFMSITFRS	DFSNEERFTG	FDAHMAVDV	DECKEREDEE
LSCDHYCHNY	IGGYCSCR	GYILHTDNRT	CRVECSDNLF	TQR TGVITSP
DFPNPYPK SS	ECLYTIELEE	GFMVNLQFED	IFDIEDHPEV	PCPYDYIKIK
VGPVKVLGPF	GEKAPEPIST	QSHSVLILFH	SDNSGENRGW	RLSYRAAGNE
CPELQPPVHG	KIEPSQAKYF	FKDQVLVSCD	TGYKVLKDNV	EMDTFQIECL
KDGTWSNKIP	TCKIVDCRAP	GELEHGLITF	STRNNLTTRYK	SEIKYSCQEP
YYKMLNNNTG	IYTCSAQGVW	MNKVLGRSLP	TCLPECGQPS	RSLPSLVKRI
IGGRNAEPGL	FPWQALIVVE	DTSRVPNDKW	FGSGALLSAS	WILTAHVLR
SQRR DTTVIP	VSK EHVTVYL	GLHDVR DKSG	AVNSSAARVV	LHPDFNIQNY
NHDIALVQLQ	EPVPLGPHVM	PVCLPRLEPE	GPAPHMLGLV	AGWGISNPV
TVDEIISSGT	R TLSDVLQYV	KLPVVPHAEC	KTSYESRSGN	YSVTENMFCA
GYEYEGGKDT	LGDSGGAFVI	FDDLSQLRWVV	QGLVSWGGPE	ECGSK QVYGV
YTK VSNIYVDW	VWEQMGLPQS	VVEPQVER		

F3. Ábra - A plazma pull-down kísérletekben azonosított MASP peptidok a MASP-3 aminosav szekvenciájában

A TFMI-3_HA inhibitorhoz kötött MASP-3 fehérjét 90 perc HA peptiddel való kompetitív elúciót követően öt peptiddel (piros háttérrel kiemelve) azonosítottuk. Az öt azonosított peptid közül egy a MASP-1 enzim közös N-terminális régiójából származik, míg a többi négy peptid a MASP-3 egyedi szerin proteáz doménjéből (szürke háttérrel kiemelve) származik.

F1. táblázat

Az oligonukleotid vagy szintetikus gén funkciója	Az oligonukleotid vagy szintetikus gén szekvenciája
A TFPI1 D2 domént kódoló szintetikus gén	<i>TCCGGAGGCTCGGGCAAACCGGACTTCTGCTTC</i> CTGGAAGAAGACCCGGGTATCTGCCGTGGTTA CATCACCCGTTACTTCTACAACAACCAGACCAA ACAGTGCGAACGTTTCAAATACGGTGGTTGCCT GGGTAACATGAACAACCTCGAAACCCTGGAAG AATGCAAAAACATCTGCGAAGACGGTGGCGGC <i>AGCGGCGGCAGCGGCGGGAGCTC</i>
A TFPI1 D2 P3-P4' STOP oligonukleotid	CCTGGAAGAAGACCCGGGT TAATGCTAATAAT AATAATAAC GTTACTTCTACAACAACCAGACC
A TFPI1 D2 P3-P4' könyvtár oligonukleotid	CCTGGAAGAAGACCCGGGT NNK TGC NNKNNKN NKNKNNNK CGTTACTTCTACAACAACCAGACC
A TFPI1 D2 pMal p2G vektorba klónozásához használt forward oligonukleotid	AGTAGGATCC AAACCGGACTTCTGC
A TFPI1 D2 pMal p2G vektorba klónozásához használt forward oligonukleotid	GTATAAGCTT ATTAACCGTCTTCGCAGATG
A TFMI-2a létrehozásához használt mutagenézis oligonukleotid	CCTGGAAGAAGACCCGGGT ATCTGCAA ACTGT TCTTCATCC GTTACTTCTACAACAACCAGACC
A TFMI-2b létrehozásához használt mutagenézis oligonukleotid	CCTGGAAGAAGACCCGGGT CCG TGCCGTGCGG TGAAACGTCGTTACTTCTACAACAACCAGACC
A TFMI-2c létrehozásához használt mutagenézis oligonukleotid.	CGGGT GTGT GCCGTGCGGTGAAACG
A TFMI-2b és TFMI-2c létrehozása során a megaprimer mutagenézis első PCR reakciójában használt reverse oligonukleotid.	CTAGTCTCGAGT GCCAAGC
A TFMI-2b és TFMI-2c létrehozása során a megaprimer mutagenézis második PCR reakciójában használt forward oligonukleotid.	GATGTCCGCTTTCTGGT ATGC

A TFMI-3 létrehozásához használt mutagenézis oligonukleotid	CCTGGAAGAAGACCCGGGTATCTGCAA <u>ACTGT</u> <u>TCTTCATCCGTTACTTCTACAACAACCAGACC</u>
Az oligonukleotid vagy szintetikus gén funkciója	Az oligonukleotid vagy szintetikus gén szekvenciája
A TFMI-3 C-terminális HA-címkét hordozó változatának előállításához használt reverse oligonukleotid	TGACCT CGAG TTATTACGCATAATCCGGCACAT CATATGGGTAAGAACCGCCGCTGCCACCGTCTTC GCAGATG
A TFMI-3 P1 pozíciójában a lizint glutamátra módosító overlap extension mutagenézis során használt forward oligonukleotid	GGTATCTGCGAACTGTTCTTCATCCG
A TFMI-3 P1 pozíciójában a lizint glutamátra módosító overlap extension mutagenézis során használt reverse oligonukleotid	GAAGAACAGTTCGCAGATACCCGGG
A szintetikus gén, ami az N-terminális His6-címkével ellátott S100A4 C3S, C81S, C86S fehérjét kódolja, amit a TEV proteáz hasítóhelye és egy rövid multiklónozó hely követ	CCATGGGGCCATCACCATCACCATCACGCTAGCA TGGCGTCCCCTCTGGAGAAGGCCCTGGATGTG ATGGTGTCCACCTTCCACAAGTACTCGGGCAA AGAGGGTGACAAGTTCAAGCTCAACAAGTCAG AACTAAAGGAGCTGCTGACCCGGGAGCTGCCC AGCTTCTTGGGGAAAAGGACAGATGAAGCTGC TTTCCAGAAGCTGATGAGCAACTTGGACAGCA ACAGGGACAACGAGGTGGACTTCCAAGAGTAC TGTGTCTTCCTGTCCTCCATCGCCATGATGTCT AACGAATTCTTTGAAGGCTTCCCAGATAAGCA GCCAGGAAGAAAG TCGACGACTACGACATCC CGACTACCGAAAACCTGTACTTCCAGGGATCCCA TATGTATGGTACCCGACTCGAG

F1. Táblázat - Az értekezésben bemutatott munka során használt szintetikus gének és DNS oligonukleotidok szekvenciája

A restriktációs endonukleáz hasítóhelyeket fékövér betűkkel jeleztem. A mutációkat létrehozó bázisokat aláhúzással emeltem ki. A Ser/Gly linkereket, His6-címkét és TEV proteáz hasítóhelyet kódoló szekvencia részleteket dőlt betűkkel jeleztem.

F2. Táblázat

Egyedi emberi MASP-2 kötő szekvenciák			Egyedi patkány MASP-2 kötő szekvenciák		
	Aminosav szekvencia	DNS szekvencia		Aminosav szekvencia	DNS szekvencia
1	LCRALMK	TTGTGCCGTGCTCTGATGAAG		PCRALGG	CCGTGCAGGGCGCTGGGGGGG
2	YCRAHKE	TATTGCAGGGCTCATAAGGAG		VCRAMAS	GTTTGCCGGGCGATGGCGTCT
3	PCRAAKR	CCGTGCCGGGCGGCGAAGCGG		VCRGYAL	GTTTGCCGTGGGTATGCTTTG
4	YCRGVRI	TATTGCCGTGGGGTTAGGATT		VCRGLKA	GTGTGCCGGGGGTTGAAGGCT
5	LCRALSM	CTGTGCCGTGCTCTGTCTATG		VCRGYAE	GTTTGCAAGGGGTTATGCTGAG
6	MCRALIS	ATGTGCCGTGCTTTGATTAGT		VCRAWFI	GTTTGCCGTGCTTGGTTTATT
7	VCRSARR	GTGTGCAGGTCGGCGAGGAGG		PCRAATE	CCGTGCCGGGCGGCTACGGAG
8	FCRAIQQ	TTTTGCCGTGCGATTACAGCAG		PCRALAY	CCTTGCAGGGCTTTGGCGTAT
9	YCRAIQM	TATTGCCGGGCGATTACAGATG		VCRALEW	GTTTGCAAGGGCTTTGGAGTGG
10	PCRALKV	CCTTGCCGTGCTTTGAAGGTG		PCRALAG	CCGTGCCGGGCGTTGGCTGGG
11	WCRAIIK	TGGTGCAGGGCTATTATTAAG		VCRAITI	GTTTGCAAGGGCTATTACGATT
12	FCRAVQL	TTTTGCCGTGCGGTGCAGCTG		PCRSLIN	CCGTGCCGGTCGTTGATTAAT
13	FCRALNI	TTTTGCAGGGCTCTTAATATT		PCRALRV	CCGTGCCGGGCTTTGCGGGTT
14	PCRALIR	CCTTGCCGTGCGTTGATTCGT		VCRGLAE	GTGTGCCGGGGGCTGGCGGAG
15	MCRAVKR	ATGTGCCGTGCGGTGAAGAGG		VCRALRV	GTTTGCCGGGCGCTTCGGGTT
16	FCRAVKF	TTTTGCAGGGCTGTTAAGTTT		PCRAINY	CCGTGCCGGGCTATTAATTAT
17	LCRGAKR	CTGTGCAGGGGTGCTAAGAGG		VCRSLQF	GTGTGCAGGTCGTTGCAGTTT
18	YCRAVVF	TATTGCCGTGCGGTTGTTTTT		PCRALLH	CCGTGCCGGGCTTTGTTGCAT
19	YCRAMKV	TATTGCCGTGCGATGAAGGTT		VCRAILLV	GTTTGCCGTGCTTTGTTGGTG
20	YCRAVRV	TATTGCCGTGCGGTTAGGGTT		VCRGYAS	GTTTGCCGTGGGTATGCTAGT
21	ACRAVKR	GCGTGCAGGGCGGTTAAGAGG		PCRSITY	CCTTGCCGTTCGCTTACTTAT
22	PCRASSV	CCTTGCCGGGCTTCTTCGGTG		PCRALFE	CCGTGCCGGGCTCTGTTTGAG
23	FCRTAHV	TTTTGCCGGACGGCTCATGTG		ICRALSL	ATTTGCCGGGCTCTGTCCCTT
24	LCRALLH	TTGTGCCGGGCTCTGCTTCAT		PCRALIE	CCGTGCAGGGCTCTGATTGAG
25	PCRAVRK	CCTTGCCGGGCGGTTTCGGAAG		GCRALSA	GGGTGCAGGGCTTTGTCCGCT
26	LCRAVSF	CTGTGCAGGGCTGTTTCCTTT		VCRSLNL	GTTTGCAAGTCTCTGAATTTG
27	FCRSLSY	TTTTGCCGGTCTCTTAGTTAT		PCRAYLQ	CCTTGCCGTGCTTATCTCCAG
28	LCRALKI	CTTTGCAGGGCGTTGAAGATT		VCRALAY	GTTTGCCGTGCTCTTGCATAT
29	VCRSAIR	GTGTGCAGGTCGGCTATTCGG		VCRAVVE	GTGTGCCGGGCGGTGGTTGAG
30	TCLSDFN	ACTTGCTTGAGTGATTTTAAT		ICRALIR	ATTTGCCGGGCGCTTATTCGG
31	FCRGLKV	TTTTGCCGTGGTTTGAAGGTT		VCRALIL	GTTTGCCGTGCGCTTATTTTG
32	LCRTAKV	CTTTGCCGGACGGCTAAGGTT		VCRALVL	GTTTGCAAGGGCTCTGGTTCTT
33	FCRALHL	TTTTGCAGGGCTCTGCATTTG		VCRALIT	GTGTGCCGTGCTCTGATTACT
34	QCRAVRR	CAGTGCAGGGCGGTTAGGAGG		VCRALFL	GTGTGCAGGGCTCTTTTCTT

35	PCRAVSR	CCTTGCAGGGCTGTTTCGCGG	PCRALTV	CCTTGCAGGGCGCTGACTGTT
36	QCRAMRR	CAGTGCAGGGCTATGCGTCGG	VCRGLLK	GTTTGCAGGGGGCTGCTGAAG
37	FCRALRS	TTTTGCAGGGCGTTGCGTAGT	PCRALRQ	CCTTGCAGGGCTTTGCGGCAG
38	LCRAVKV	CTGTGCCGTGCGGTGAAGGTT	ICRALQM	ATTTGCCGTGCGTTGCAGATG
39	FCRAIKD	TTTTGCCGTGCTATTAAGGAT	PCRALYL	CCTTGCCGTGCTCTGTATTTG
40	LCRAALR	CTGTGCAGGGCGGCGTTGCGG	VCRALIN	GTGTGCAGGGCTCTTATTAAT
41	LCRAVKL	CTGTGCCGGGCTGTGAAGTTG	PCRSLIF	CCGTGCCGGTCGTTGATTTTT
42	QCRGARQ	CAGTGCCGTGGGGCGAGGCAG	PCRGLAR	CCGTGCAGGGGGCTTGCTAGG
43	PCRGVRR	CCGTGCCGTGGTGTGCGGCGG	VCRAVLY	GTTTGCAGGGCGGTTCTTTAT
44			VCRALTV	GTGTGCAGGGCGTTGACTGTT
45			PCRAMTL	CCGTGCCGGGCTATGACGTTG
46			ICRGLIL	ATTTGCCGTGGTCTGATTTTG
47			PCRGLKS	CCGTGCAGGGGGCTTAAGAGT
48			VCRSLAL	GTTTGCCGTTCTTTGGCTCTG
49			PCRSLKM	CCGTGCCGGTCGCTTAAGATG
50			VCRAWAY	GTTTGCAGGGCGTGTGCGTAT
51			PCRGLSC	CCTTGCCGGGGTCTTTTCGTGT
52			VCRSCSI	GTTTGCCGGTCTTGTTCTATT
53			PCRSLIC	CCTTGCCGTAGTCTGATTTGT

F2. Táblázat - A specifikus emberi és patkány MASP-2 kötő TFPI1 D2 klónok aminosav szekvenciái a P3-P4' régióban, és az ezeket kódoló DNS szekvenciák

F3. Táblázat

Egyedi emberi MASP-3 kötő szekvenciák

	Aminosav szekvencia	DNS szekvencia
1	ICKILLI	ATTTGCAAGATTCTGCTTATT
2	ICKILLI	ATTTGCAAGATTTTGCTTATT
3	ICKLFFL	ATTTGCAAGCTTTTTTCTT
4	ICKLFFV	ATTTGCAAGCTGTTTTTGTT
5	ICKLLFL	ATTTGCAAGCTTCTTTTCTT
6	ICRLFFI	ATTTGCCGGCTTTTTTTTATT
7	ICRLFFI	ATTTGCCGTTTGTTTTTTATT
8	ICRLFFV	ATTTGCAGGCTGTTTTTGTT
9	ICRLFFV	ATTTGCCGTCTGTTTTTTGTG
10	ICRLFFV	ATTTGCCGTTTGTTTTTGTT
11	ICRLFI	ATTTGCAGGCTTCTGTTTATT
12	ICRLFI	ATTTGCAGGTTGCTTTTTTATT
13	MCKLFFI	ATGTGCAAGCTGTTTTTTATT
14	RCKLFFI	CGTTGCAAGCTTTTTTTTATT
15	RCKLFFV	AGGTGCAAGCTTTTTTTTGTT
16	RCRLFI	CGTTGCCGTATTCTGTTTATT
17	RCRLFFA	AGGTGCAGGTTGTTTTTGCT
18	RCRLFFI	AGGTGCAGGCTTTTTTTTATT
19	RCRLFFI	AGGTGCCGTTTGTTTTTTATT
20	RCRLFFL	AGGTGCAGGTTGTTTTTTTG
21	RCRLFFL	CGGTGCCGGCTGTTTTTTTG
22	RCRLFFV	AGGTGCCGGTTGTTTTTCGTG
23	RCRLFFV	CGGTGCAGGCTTTTTTTTG
24	RCRLFFV	CGTTGCCGTCTTTTTTTTG
25	RCRLFI	AGGTGCAGGCTGCTGTTTATT
26	RCRLFI	CGGTGCAGGTTGCTTTTTTATT
27	RCRLFI	CGTTGCCGTTTGTTTATT
28	VCKILLI	GTTTGCAAGATTTTGCTTATT
29	VCKLFFI	GTTTGCAAGTTGTTTTTCATT
30	VCKLFFV	GTGTGCAAGCTTTTTTTTGTT
31	VCRLFFI	GTTTGCCGGCTGTTTTTTATT

F3. Táblázat - A specifikus emberi MASP-3 kötő TFPI1 D2 klónok aminosav szekvenciái a P3-P4' régióban, és az ezeket kódoló DNS szekvenciák

F4. Táblázat

Fehérje (UniProt ID)	Peptid szekvencia	Valószínűség
Ficolin H (O75636-1)	(K)GEPGDPVNLLR(C)	100%
	(R)QDGSVDFFR(S)	100%
	(R)AGFGNQESEFWLGNENLHqLTLQGNWELR(V)	100%
	(R)AGFGNQESEFWLGNENLHQLTLQGNWELR(V)	91%
	(R)LLGEVDHYQLALGK(F)	100%
	(K)FSEGTAGDSLHSGR(P)	100%
	(R)YAVSEAAHK(Y)	100%
	(K)YGIDWASGR(G)	100%
MASP-3 (P48740-2)	(R)TGVITSPDFNPYPK(S)	99%
	(R)RDTTVIPVSK(E)	88%
	(R)DTTVIPVSK(E)	100%
	(K)EHVTVYLGGLHDVR(D)	100%
	(R)TLSDVLQYVK(L)	100%
	(K)QVYGVYTK(V)	99%

F4. Táblázat - A TFMI-3_HA inhibitorhoz kötő plazma fehérjék és azok azonosított triptikus peptidjei

Az azonosítás küszöbértéke >80% volt peptid szinten és >95% fehérje szinten. A szekvenciákban q dezaminálódott Q csoportokat jelöl, amelyek tömege a Q csoportokhoz képest +1 Da.

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Szakács Dávid**

MTMT-azonosító: **10032739**

A doktori értekezés címe és alcíme: **A MASP-2 terápiás célú gátlása és a MASP-3 szerepének feltárása irányított fehérjeevolúcióval kifejlesztett inhibitorokkal**

DOI-azonosító: **10.15476/ELTE.2019.143**

A doktori iskola neve: **ELTE Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Szerkezeti biokémia doktori program**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **dr. Pál Gábor, PhD**

A témavezető munkahelye: **ELTE Biokémiai Tanszék**

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

- a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.
- b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;
- c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum) ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;
- d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

- a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

- b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2019.06.17.



a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet